



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação de três protocolos de secagem em bovinos leiteiros

Valdemar Manuel de Sousa

Orientadora da Universidade de Évora: Professora
Doutora Elisa Maria Varela Bettencourt

Orientador externo: Dr. João Guilherme Paisana

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação de Natureza Científica

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação de três protocolos de secagem em bovinos leiteiros

Valdemar Manuel de Sousa

Orientadora da Universidade de Évora: Professora
Doutora Elisa Maria Varela Bettencourt

Orientador externo: Dr. João Guilherme Paisana

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação de Natureza Científica

Évora, 2017

Agradecimentos

Às pessoas que mais amo neste mundo, os meus pais. Sem eles, o meu sonho nunca se teria concretizado e tudo o que faço é por eles.

Aos meus avós, por tudo o que me ensinam e por me terem transmitido a paixão enorme que tenho pelos animais.

À professora Elisa Bettencourt, por toda a orientação, apoio e paciência durante todo este tempo.

Ao Dr. João Paisana, por todos os ensinamentos, paciência, amizade e confiança demonstrada.

A todo o staff da agro-pecuária Afonso Paisana, em especial ao Adilson e à Regina por todo o auxílio durante a realização do estudo.

Ao Pedro Castro, por todo o apoio que me deu durante o estágio, bem como o seu espírito de camaradagem e amizade.

Aos meus amigos, por estarem sempre comigo nos bons e maus momentos e por me terem acompanhado nesta “odisseia” que foi o meu percurso académico.

A todos eles, o meu grande obrigado!

Resumo

As mastites são uma das doenças mais importantes numa exploração leiteira, sendo o período seco uma das alturas indicadas para o seu tratamento. No presente estudo os animais foram sujeitos a três protocolos de secagem diferentes, um deles constituído apenas por um selante interno e os outros dois por uma combinação entre um antibiótico e o mesmo selante. O critério de escolha de cada protocolo baseou-se na média das duas últimas contagens de células somáticas (CCS). A contagem de células somáticas no momento da secagem foi utilizada para aferir a exatidão desse critério, tendo-se verificado que em 45,5% dos casos não houve concordância entre os dois momentos de avaliação. Todos os protocolos se revelaram eficazes na profilaxia de mastites subclínicas, sendo que, a administração apenas de selante se revelou eficaz na prevenção de novas infeções. Os protocolos com antibioterapia e selante revelaram-se eficazes na redução das infeções já existentes.

Palavras chaves: mastites; células somáticas; terapia; secagem; prevenção

Evaluation of three dry-off protocols in dairy cattle

Abstract

Mastitis is one of the most important diseases in a dairy farm, where the dry period is a good time for its treatment. In the present study, the animals were subjected to three different dry-off protocols, one consisting only in an internal sealant and the other two by a combination of an antibiotic and the same sealant. The criterion of choice for each protocol was based on the mean of the last two somatic cell counts (SCC). The somatic cell count at the time of dry-off was used to check the accuracy of this criterion, and it was verified that in 45.5% of cases there was no agreement between the two moments of evaluation. All protocols showed to be effective in the prophylaxis of subclinical mastitis, including the use of merely teat sealant, which was effective in preventing new infections. Protocols with antibiotic and sealant were effective in reducing existing infections.

Key words: mastitis; somatic cells; therapy; dry-off; prevention

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de gráficos.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas	x
1.Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1 Mastites: fatores de risco.....	2
2.1.1. Vaca como hospedeiro.....	2
2.1.2. Microrganismos.....	3
2.1.3. Ambiente.....	3
2.2 Impacto económico da mastite numa exploração leiteira	4
2.3. Controlo de mastites	6
2.4. Anatomia da glândula mamária	7
2.5. Mecanismos de defesa da glândula mamária	8
2.5.1. Barreiras anatómicas	8
2.5.2. Defesas celulares.....	9
2.5.3. Fatores solúveis.....	11
2.6. Patogenia.....	13
2.7. Etiologia.....	13
2.7.1. Agentes contagiosos	14
2.7.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.7.1.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
2.7.1.3. <i>Mycoplasma</i> spp.....	15
2.7.1.4. <i>Corynebacterium bovis</i>	15
2.7.2. Agentes ambientais.....	16
2.7.2.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	16

2.7.2.2. <i>Streptococcus uberis</i>	17
2.7.2.3. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	17
2.7.2.4. Coliformes	17
2.7.2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	18
2.7.2.4.2. <i>Klebsiella</i> spp.	18
2.7.2.4.3. <i>Serratia</i> spp.	18
2.7.2.5. <i>Prototheca</i> spp.	19
2.8. Classificação e sinais clínicos.....	19
2.9. Diagnóstico	20
2.10. Tratamento de mastites durante a lactação	24
2.10.1. Antibioterapia em vacas em lactação.....	25
2.10.1.1. Beta-lactâmicos.....	28
2.10.1.2. Aminoglicosídeos	29
2.10.1.3. Lincosamidas	29
2.10.1.4. Sulfonamidas+trimetoprim	29
2.10.2. Resistências antimicrobianas no tratamento de mastites	30
2.10.3. Fluidoterapia	31
2.10.4. Anti-inflamatórios	32
2.10.5. Ocitocina e aumento da frequência da ordenha	32
2.11. Período Seco	32
2.11.1. Maneio alimentar na prevenção de infecções.....	33
2.10.2. Tratamento de mastites durante o período seco	35
II. Trabalho experimental.....	39
1. Materiais e métodos.....	39
1.1. Amostra	39
1.2. Desenho experimental	39
1.3. Recolha de amostras	40
1.4. Análise estatística	41
2. Resultados.....	42
2.1. Resultados de CCS1 e CCS2.....	42

2.2. Concordância entre o critério utilizado para a escolha do protocolo e a CCS1	43
2.3. Evolução dos resultados de CCS1 e CCS2	44
2.4. Evolução dos resultados da contagem de células somáticas em função da existência ou não de concordância entre o critério utilizado e a CCS1	46
2.5. Comparação entre os três protocolos utilizados.....	49
2.6. Influência do número de lactações na existência de mastite subclínica no pós-parto através da avaliação da CCS2	50
2.7. Influência da duração do período seco na existência de mastite subclínica no pós-parto através da avaliação da CCS2	52
2.8. Incidência de mastite clínica na exploração	53
3. Discussão	54
4. Conclusão.....	56
5. Bibliografia	58
Anexo I: Noroseal®: Resumo das características do medicamento.....	a
Anexo II: Cepravin®: Resumo das características do medicamento.....	e
Anexo III: Virbactan ®: Resumo das características do medicamento	j

Índice de gráficos

Gráfico 1- Distribuição do número de lactações em função da CCS2	52
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1- Diminuição de produção de leite em função do aumento da CCS	5
Tabela 2-Principais agentes etiológicos de mastites em bovinos.....	14
Tabela 3-Sistema de classificação de mastites clínicas.....	20
Tabela 4-Leitura e interpretação do TCM.....	22
Tabela 5-Distribuição dos agentes patogénicos na glândula mamária	26
Tabela 6-Famílias de antimicrobianos intramamários para tratamento durante a lactação em Portugal	30
Tabela 7- Lista de Antimicrobianos autorizados em Portugal para o tratamento intramamário em vacas no período seco	37
Tabela 8- Distribuição dos animais pelos diferentes protocolos e pelo respetivo número de lactações.....	40
Tabela 9- Contagem de células somáticas no momento da seca.....	42
Tabela 10- Contagem de células somáticas cinco a sete dias após o parto	43
Tabela 11- Concordância entre o critério utilizado para a escolha do protocolo e o resultado da CCS1	44
Tabela 12- Distribuição dos valores da CCS1 em função do protocolo utilizado	44
Tabela 13- Evolução entre os resultados da CCS1 e CCS2	45
Tabela 14- Evolução entre os resultados de CCS1 e CCS2 para cada protocolo utilizado	46
Tabela 15- Evolução dos resultados de CCS1 e CCS2 em função da existência ou não de concordância entre o critério utilizado e a CCS1.....	47
Tabela 16- Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em protocolos recomendados de acordo com os critérios estabelecidos	48
Tabela 17- Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em protocolos que não seguiram os critérios previamente estabelecidos.....	49
Tabela 18-Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em função do protocolo escolhido e do estadio inicial	50
Tabela 19- CCS2 em função do número de lactações.....	51
Tabela 20-Distribuição dos animais em função da duração do período seco	53
Tabela 21-Influência da duração do período seco na CCS2 com base na duração do período seco	53

Índice de figuras

Figura 1-Interação entre vaca, microrganismos e ambiente.....	2
Figura 2-Anatomia do úbere	8
Figura 3-Diagrama ilustrativo da resposta inflamatória da glândula mamária.....	9
Figura 4-Realização de um TCM.....	21
Figura 5-Fossomatic.....	23
Figura 6-Administração de um aplicador com selante interno	37
Figura 9-Administração de um protocolo de secagem	42

Lista de Abreviaturas

- ADN- Ácido desoxirribonucleico
- AINE's- Anti-inflamatórios não esteroides
- ALIP- Associação Interprofissional do leite e laticínios
- CD4+ - *Cluster of differentiation 4+*
- CD8+ -*Cluster of differentiation 8+*
- CSF-Fatores estimulantes de colônias (*Colony stimulating factor*)
- CCS-Contagem de células somáticas
- CIM- Concentração inibitória mínima
- EMA- Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*)
- FA-Frequência absoluta
- FC-Frequência cumulativa
- FR-Frequência relativa
- IFN- γ -Interferão gama
- Ig- Imunoglobulinas
- IL-Interleuquinas
- IIM- Infecção intramamária
- LPS-Lipossacarídeos
- LTA-Ácido lipoteicóico (*Lipoteichoic acid*)
- MHC-Complexo maior de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)
- MSC-Mastite subclínica
- NIRD- *National Institute for Research into Dairying*
- NMC- Conselho Nacional de Mastites (*National Mastitis Council*)
- NRC- Conselho Nacional de Pesquisa (*National Research Council*)
- OMG-Organização Mundial de Saúde
- PAMP-Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)
- PBP-Proteínas de ligação de penicilina (*Penicilin binding proteins*)
- PCR- Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*)
- PGN-Peptidoglicanos
- SCN- *Staphylococcus* coagulase negativo
- TCM-Teste Californiano de Mastites
- TLR-Recetores Toll Like (*Toll-like receptors*)
- TNF- α - Fator tumoral de necrose alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)
- TSA-Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
- UFC-Unidades formadoras de colônias

1.Introdução

O período seco é uma altura crítica no ciclo de lactação, sendo um ótimo momento para tratar infecções intramamárias (IIM) existentes, bem como um período de alto risco para novas infecções. Investigações recentes realçam a importância das infecções adquiridas durante esta fase e demonstraram que as mesmas podem influenciar a incidência de mastites clínicas nas lactações subsequentes (Bradley et al., 2010).

Este estudo decorreu na exploração agro-pecuária Afonso Paisana, na localidade de Foros de Salvaterra, concelho de Salvaterra de Magos. A vacaria em questão tem um total de 520 animais, estando 260 vacas em lactação, com uma média de 180 dias de lactação e apresentam uma produção média diária entre os 32 e os 39 litros.

O desenho experimental escolhido vem do interesse do próprio produtor/médico veterinário em saber se o critério de escolha da terapia de secagem que está implementado na exploração é eficiente. Na vacaria em questão, existem três protocolos de secagem, sendo que a sua escolha é realizada em função da média da contagem de células somáticas (CCS), obtidos a partir dos dois últimos registos de contraste leiteiro. Na sequência desta média é aplicado a cada animal um diferente protocolo de secagem. Assim, para animais com um CCS média inferior a 200.000 células/ml é aplicado apenas um selante interno (ver anexo I), constituído por 2,6g de subnitrato de bismuto pesado (Noroseal®). Para as vacas com os registos da CCS entre as 200.000 e 400.000 células/ml é administrado um antibiótico, cujo princípio ativo é o cefalónio, uma cefalosporina de primeira geração (Cepravin®), enquanto para animais com valores acima das 400.000 células/ml é utilizado cefquinoma (Virbactan®) que também é uma cefalosporina, mas neste caso de quarta geração. Estes dois antimicrobianos são administrados em combinação com o mesmo selante interno referido, sendo este sempre usado a seguir à aplicação do antibiótico. Ambos os medicamentos estão indicados para o tratamento de mastites subclínicas, bem como, para a prevenção de novas infecções que possam ocorrer neste período (ver anexo II e III). A terapia de secagem é realizada a seguir à última ordenha do animal, em que o operador deve usar uma técnica asséptica para prevenir possíveis contaminações.

Este estudo tem como objetivos:

- Avaliar a eficácia dos três protocolos de secagem na redução de mastites clínicas e subclínicas;
- Avaliar a concordância entre o critério utilizado para a escolha do protocolo e contagem de células somáticas realizada no momento da seca;
- Avaliar a influência do número de lactações na ocorrência de mastite subclínica no pós-parto;
- Avaliar a influência da duração do período de secagem na ocorrência de mastite subclínica no pós-parto;

2. Revisão bibliográfica

2.1 Mastites: fatores de risco

Por definição, a mastite é uma inflamação do parênquima da glândula mamária, independentemente da causa. É caracterizada por alterações físicas e químicas no leite e também por alterações patológicas do tecido glandular (Radostits, et al. 2007).

A mastite pode ser considerada uma doença multifatorial que inclui: 1) a vaca como hospedeiro; 2) os microrganismos como agentes causais; e 3) o ambiente, o qual afeta tanto a vaca como o microrganismo causal (Oviedo-Boyso et al., 2007); (Figura 1).

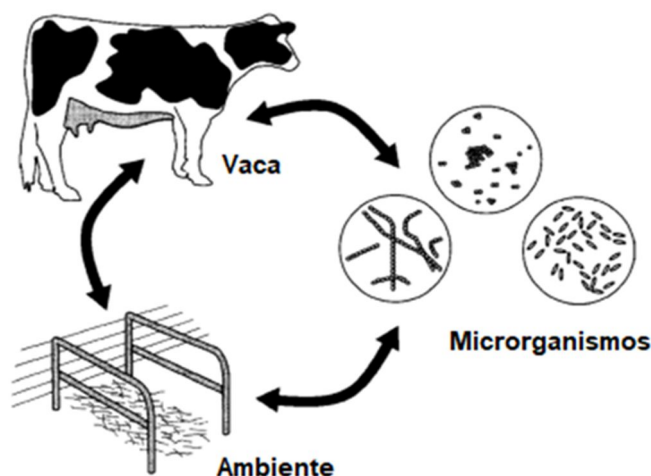


Figura 1-Interação entre vaca, microrganismos e ambiente (Adaptado de Schroeder,2012)

2.1.1. Vaca como hospedeiro

Numa vacaria existem animais que são mais suscetíveis ao desenvolvimento de mastites do que outros, o que pode ser devido à existência de certos fatores de risco individuais.

A idade e o número de lactações são uns desses fatores, em que se observa que vacas com um maior número de partos estão sujeitas a um maior risco de desenvolver mastite. No estudo de Cardozo et al (2015), vacas com quatro ou mais lactações têm mais 1,71 hipóteses de possuírem uma CCS acima das 200.000 células/ml comparativamente a vacas primíparas. Isto pode dever-se a certas características da conformação do úbere que se vão degradando com a idade, como por exemplo alterações do aparelho suspensor que conduzem à descida do úbere, permitindo que este fique em maior contato com os microrganismos presentes no solo (Cardozo et al.,2015). Também é notório que vacas com alta paridade tendem a ter mais

lesões na glândula mamária durante a lactação o que pode originar infecções mais prolongadas (Cardozo et al., 2015).

Também as características do teto podem aumentar o risco de infecção, por exemplo, vacas que apresentem um canal do teto com menor comprimento e um diâmetro maior são mais suscetíveis a desenvolver mastite (Blowey & Edmondson, 2010b).

Segundo Guarín e Ruegg (2016), vacas que apresentem quartos com grandes picos de fluxo de leite têm um risco maior de presença de mastites clínicas. A explicação prende-se com a seleção realizada nos recentes anos para o aumento da velocidade de ejeção do leite e que pode ter influenciado a anatomia do teto (por exemplo, o diâmetro maior), conduzindo a uma menor eficiência na proteção contra a invasão de agentes patogénicos.

A fase de lactação é outro fator importante para a incidência de novas infecções, sendo o início do período seco e o parto as alturas mais suscetíveis (Ruegg et al., 2015).

2.1.2. Microrganismos

Os agentes etiológicos da mastite, cuja descrição será realizada mais à frente, apresentam uma grande variedade de fatores de virulência relacionados com a sua capacidade de colonização e manutenção da glândula mamária, como a capacidade de aderir ao epitélio mamário, de se multiplicar no leite, e capacidade de danificar os tecidos mamários e de induzir a inflamação, como o poder toxigénico.

Estes agentes etiológicos, possuem outros fatores de risco como a viabilidade, isto é, a capacidade de sobreviver no ambiente resistindo à limpeza e desinfecção. Os agentes causadores de mastite contagiosa são mais suscetíveis à desinfecção do que os agentes ambientais (Radostits et al., 2007).

2.1.3. Ambiente

Sendo que numa vacaria de leite os animais passam a maior parte do seu tempo deitados e estabulados, a qualidade das instalações e o manejo vão desempenhar um papel fundamental na ocorrência de mastites (Radostits et al, 2007).

O estado de limpeza dos úberes reflete as condições de manejo de uma vacaria. Sabe-se que em vacas com úberes sujos o número de células somáticas aumenta, bem como a prevalência de novas infecções.

O nível de ventilação, a dimensão dos cubículos, a densidade animal nos parques, a limpeza frequente das camas e a escolha de um material de camas que limite o crescimento bacteriano, são fundamentais para a diminuição da prevalência de IIM por agentes ambientais (Radostits et al, 2007).

A época do ano também influencia a ocorrência de mastites por coliformes, sendo que as chamadas “mastites de verão” ocorrem sobretudo em animais estabulados em zonas geográficas muito quentes. No inverno verifica-se um aumento da incidência de mastites causadas por estes agentes, sobretudo em alturas de maior precipitação (Radostits et al, 2007).

O manejo da vaca durante a ordenha é também um importante fator a ter em atenção. Segundo Cardozo et al, citando Dufour et al. (2011), práticas como o uso de luvas por parte dos ordenhadores durante a ordenha, a remoção dos primeiros jatos de leite, o uso de um copo de fundo preto para despiste de mastite clínica, a desinfecção dos tetos antes e depois da ordenha, bem como deixar as vacas com CCS altas e mastites clínicas para serem ordenhadas em último lugar vão fazer com que os valores de CCS baixem.

As máquinas de ordenha podem também contribuir para o aumento do risco de mastite ao influenciarem as características da pele e do canal do teto (Guarín & Ruegg, 2016), devendo ser realizada uma manutenção periódica (Cardozo et al., 2015). Como exemplo de uma dessas alterações temos a congestão e edema do teto, que podem comprometer os mecanismos de defesa e aumentar o risco de infeção intramamária (Mein, 2012).

A ocorrência de hiperqueratose pode ser devida às inadequadas pulsações da máquina, à remoção das tetinas sem parar o vácuo e à sobreordenha. Os defeitos no equipamento de ordenha podem influenciar o estado do úbere, devendo-se esporadicamente mudar as borrachas das tetinas e verificar o nível do vácuo, pois se este estiver muito alto pode provocar lesões nos tetos (Cardozo et al., 2015).

2.2 Impacto económico da mastite numa exploração leiteira

A mastite é uma doença endémica, considerada como uma das mais frequentes e mais dispendiosas nas explorações de bovinos leiteiros em todo o mundo (Halasa et al., 2007). A sua prevenção deve ser considerada uma prioridade, tanto para produtores, como para médicos veterinários, por razões económicas e de saúde pública (Bexiga et al., 2005).

O produtor, muitas vezes, não tem consciência de quanto os casos de mastites podem ser dispendiosos (Hogeveen et al., 2011). Fazer uma estimativa de quanto custa um caso de mastite por vaca e por ano é um processo muito complexo, dependendo de vários fatores, como a região e modo de funcionamento do mercado do setor leiteiro (Halasa et al., 2007).

As consequências económicas desta doença podem ser diversas, começando pelas quebras de produção leiteira, que estão diretamente relacionadas com o aumento na contagem de células somáticas (CCS) (tabela 1), conduzindo a penalizações para o produtor.

Tabela 1- Diminuição de produção de leite em função do aumento da CCS (Adaptado de Aires, 2010)

CCS no leite (células/ml)	Diminuição na produção (%)	Perda na produção por vaca/lactação (Kg)
100.000	3	210
200.000	6	420
300.000	7	490
400.000	8	560
500.000	9	630
600.000	10	700
700.000	11	770
1.000.000	12	870

Em relação às penalizações, para além da contagem de células somáticas, estas têm também em linha de conta a carga microbiana total. De acordo com o ponto 5, III, secção IX do regulamento (CE) nº853/04 alterado pelo Anexo II do Regulamento (CE) nº1 662/2006, de 6 de novembro, quando o leite cru de vaca apresenta um valor médio¹ superior a 100.000 unidades formadoras de colónias (UFC)/ml e um valor médio superior 400.000 células somáticas/ml, os operadores responsáveis pela recolha do leite devem alertar as entidades responsáveis e tomarem medidas junto do produtor, tendo este, três meses para corrigir a situação. Passado esse período, se a situação se mantiver, as mesmas autoridades vão notificar o produtor por mais um período semelhante e por fim, caso o problema não seja resolvido, a recolha de leite é suspensa, sendo ainda a exploração multada (as coimas podem atingir um máximo de 3750€ ou 44890€, consoante o agente seja pessoa singular ou coletiva).

Além da diminuição de produção leiteira existem outros custos, como os que estão associados ao tratamento das mastites e às perdas devido ao leite que vai ser rejeitado para consumo humano, constituindo uma despesa indireta.

Os serviços médico-veterinários, a mão-de-obra extra, os meios de diagnósticos, bem como o aumento das taxas de mortalidade e de refugo são também considerados custos associados (Halasa et al., 2007).

Os custos devido ao refugo são um parâmetro difícil de estimar. Esta é uma medida utilizada frequentemente como metodologia de prevenção, ao evitar o risco de novas infeções no próprio animal ou mesmo a transmissão para outros (Hogeveen et al., 2011).

Apesar de todas as limitações que existem para determinar quais os verdadeiros custos das mastites, as recentes estimativas indicam que as perdas económicas em casos de mastites clínicas variam entre os 61€ e os 97€ por vaca/ano. As perdas adicionais devido a casos de mastites subclínicas rodam em média os 13€ por vaca/ano (Hogeveen et al., 2011).

¹ Estes valores são obtidos através de uma média geométrica constatada ao longo de dois meses, no caso do teor da carga microbiana total e três meses nas células somáticas

2.3. Controlo de mastites

Tendo em conta o impacto económico desta doença e os vários fatores predisponentes da sua ocorrência nas explorações, deve ser implementado um bom plano de controlo. Os planos de controlo de mastites têm vindo a ser alvo de várias abordagens. Fazendo um enquadramento histórico, e com base na predominância dos agentes contagiosos foi desenvolvido nos anos 60 um “plano de controlo dos cinco pontos” pelo *National Institute for Research into Dairying* (NIRD). Deste plano fazem parte a higiene do úbere e da ordenha, a antibioterapia de secagem a todas as vacas, o tratamento das mastites clínicas durante a lactação, o refugo dos animais com mastites crónicas e a utilização e manutenção apropriada das salas de ordenha (Biggs, 2009).

Estas medidas fizeram com que, ao longo dos anos, existisse uma evolução considerável no controlo e prevalência dos agentes contagiosos, bem como uma redução na incidência de casos de mastites clínicas e subclínicas e, consequentemente, na redução da CCS nos tanques (Bradley, 2002).

Atualmente, os agentes patogénicos mais isolados são os ambientais, o que levou a que as medidas de prevenção fossem mais redirecionadas para esses microrganismos (Ruegg, 2012). Assim sendo, foram adicionados mais cinco novos componentes pelo *National Mastitis Council* (NMC), passando a denominar-se como “plano dos dez pontos”. Este novo protocolo engloba todas as medidas anteriores e ficou organizado da seguinte forma:

1. Estabelecimento de objetivos para a saúde do úbere;
2. Manutenção de um ambiente adequado para os animais (limpo, seco e confortável);
3. Estabelecimento de procedimentos de ordenha adequados;
4. Uso e manutenção apropriados do equipamento de ordenha;
5. Registo de dados completo e atualizado;
6. Tratamento adequado da mastite clínica durante a lactação;
7. Maneio eficiente das vacas secas;
8. Manter as medidas de biossegurança nos casos de agentes patogénicos contagiosos e considerar o refugo de vacas com mastites crónicas;
9. Monitorização regular da saúde do úbere;
10. Revisão regular dos programas de controlo da mastite (Ruegg et al., 2015);

2.4. Anatomia da glândula mamária

Para percebermos todo o processo que leva ao desenvolvimento de mastite, o conhecimento da anatomia do úbere da vaca bem como da produção de leite e sua expulsão é muito importante.

Histologicamente, a glândula mamária deriva de tecido sudoríparo modificado (Blowey & Edmondson, 2010a).

O úbere da vaca é composto por quatro glândulas mamárias individuais, referidas também como quartos. Estes são independentes e não existe comunicação entre eles. Cada quarto consiste num teto com uma abertura simples (canal) e em cisternas que estão presentes no teto e na base da glândula, bem como um sistema de ductos e tecido secretor (Ruegg et al., 2015). O desenvolvimento da glândula mamária, desde o nascimento da vitela até ao início da 1ª lactação, está dividido em quatro fases: a primeira fase isométrica, em que o crescimento e desenvolvimento acompanha o mesmo ritmo que o restante corpo. A primeira fase alométrica que ocorre aproximadamente entre os quatro e os oito meses de idade e está associada com os picos de estrogénio. A seguir, a segunda fase isométrica até ao início da gestação e por fim, a segunda fase alométrica em que existe novamente um rápido desenvolvimento do úbere. Durante esta última fase, as células alveolares tornam-se mais desenvolvidas e com capacidade para segregar leite (Blowey and Edmondson, 2010a).

O tecido secretor é organizado em lobos, que, por sua vez, são constituídos por múltiplos lóbulos que contêm alvéolos que são a unidade fisiológica da glândula. O alvéolo é constituído por células epiteliais, que sintetizam e segregam o leite, rodeadas por células mioepiteliais, que têm como papel a expulsão do leite dos alvéolos para os canais galactóforos e, conseqüentemente, para as cisternas, o que permite uma acumulação de leite entre as ordenhas.

A ejeção do leite ocorre em resposta a uma estimulação tátil dos tetos que desencadeia um reflexo neuro hormonal que faz com que a neurohipófise liberte ocitocina para a corrente sanguínea. A presença desta hormona provoca a contração das células mioepiteliais que vão expulsar o leite. A secreção da ocitocina é pulsátil, o que permite que não haja excesso de leite para dentro da cisterna (Tucker, 1985 referido por Nunes, 2004).

O úbere da vaca leiteira é um órgão geralmente pesado, pelo que se torna de extrema importância a existência de um sistema de suspensão muito forte, bem como, uma boa irrigação sanguínea. Por cada litro de leite produzido existe um aporte de cerca de 400 litros de sangue para aquela região. A suspensão do úbere (figura 2) é feita pelo ligamento suspensor médio (formado por duas lâminas de tecido conjuntivo elástico), pelos ligamentos suspensores laterais (profundos e superficiais, formados por tecido conjuntivo não elástico) e por fim, com um papel mais secundário, a pele e o tecido subcutâneo (Biggs, 2009).

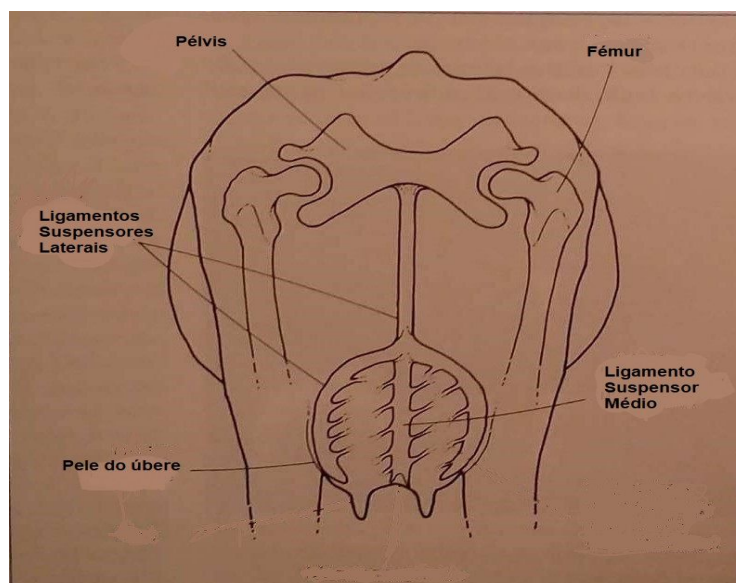


Figura 2-Anatomia do úbere (adaptado de Biggs,2009)

2.5. Mecanismos de defesa da glândula mamária

No geral, o sistema imunitário é caracterizado pela sua capacidade de reconhecer e discriminar entre agentes invasores e moléculas produzidas pelo organismo.

O tecido da glândula mamária é protegido por duas formas de mecanismos de defesa imunitária (Oviedo-Boyso et al.,2007).

A imunidade inata é o tipo de defesa mais predominante na fase inicial da infecção, contudo, a sua resposta não aumenta pelas repetidas exposições ao mesmo agente. Este tipo de imunidade inclui as barreiras físicas e é mediado por macrófagos, neutrófilos, células natural *killer* e por certos fatores solúveis.

Por outro lado, a imunidade específica ou adquirida reconhece determinantes específicos dos agentes patogénicos e ativam uma eliminação seletiva. Esta seleção é mediada por anticorpos, macrófagos e linfócitos. Devido à “memória” de certos linfócitos, a resposta adquirida pode ser aumentada com a repetida exposição aos antígenos.

Estes dois tipos de resposta interagem de modo a conferir proteção contra os agentes responsáveis pelo surgimento de mastites.

2.5.1. Barreiras anatómicas

Antes que ocorra infecção que cause uma mastite, a vaca tem barreiras anatómicas que impedem a invasão de agentes patogénicos no canal do teto (figura 3A). Estas barreiras pertencem à imunidade inata ou não-específica (Sordillo, 2005).

A pele do teto é um desses mecanismos de defesa, uma vez que é constituída por um epitélio escamoso estratificado e, na sua superfície, por células mortas com queratina que promovem a inibição do crescimento bacteriano. Na pele estão ainda presentes ácidos gordos, como o ácido mirístico, o ácido palmitoleico e o ácido linoleico que funcionam como bacteriostáticos.

O canal do teto tem propriedades antibacterianas semelhantes à pele e que se tornam mais efetivos quando a contração do esfíncter leva ao encerramento do canal, reduzindo o risco de invasão entre ordenhas (Blowey & Edmondson, 2010b). O aumento da permeabilidade do esfíncter está diretamente relacionado com o aumento da incidência de mastites.

Próximo da altura do parto, dentro da glândula mamária vai ocorrer uma grande acumulação de fluidos que vão provocar o aumento da pressão intramamária. A glândula está assim mais suscetível ao risco de infeção, especialmente pela dilatação do canal do teto e pela libertação de secreções mamárias (Sordillo & Streicher, 2002).

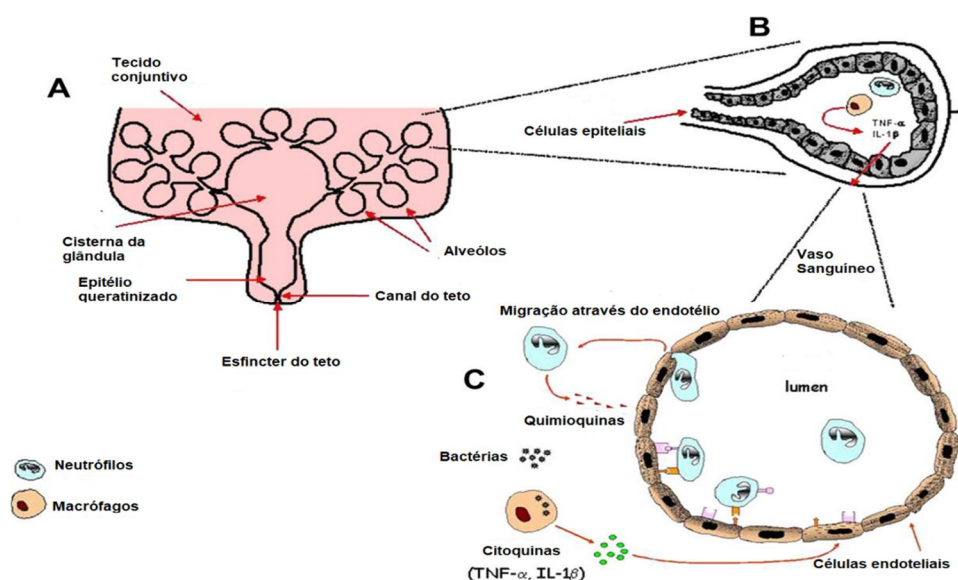


Figura 3-Diagrama ilustrativo da resposta inflamatória da glândula mamária (adaptado de Oviedo-Boyso et al, 2007)

A) Barreiras anatómicas da glândula mamária;

B) Fatores celulares e solúveis intervenientes na resposta inata: macrófagos localizados nos alvéolos fagocitam as bactérias que entram na cisterna da glândula mamária, depois de ativados libertam citocinas como TNF α e IL-1;

C) Células endoteliais dos vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos expressam moléculas de adesão em resposta às citocinas pró-inflamatórias, facilitando o recrutamento dos neutrófilos em circulação para o sítio da infeção.

2.5.2. Defesas celulares

Quando a exposição aos agentes microbianos é suficiente para atravessar o canal do teto e se multiplicarem no leite, passamos a ter uma segunda linha de defesa, com barreiras celulares e solúveis, pertencentes à resposta inata e adquirida.

Os macrófagos são as células dominantes presentes no leite de uma glândula mamária saudável, têm função idêntica aos neutrófilos, em que vão fagocitar e destruir as bactérias (figura 3B). O número de macrófagos tende a diminuir com o avançar da inflamação.

Acredita-se que este tipo de células têm um papel fulcral na imunidade não específica ao secretarem substâncias que facilitam a migração e a atividade bactericida dos neutrófilos (Sordillo & Streicher, 2012). Apresentam também um papel importante no desenvolvimento da imunidade adquirida através do processamento e apresentação do antígeno em associação com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II (Sordillo, 2005).

As alterações nas funções dos macrófagos são evidenciadas no período do parto, estando diretamente relacionadas com o aumento da incidência da infeção. Embora haja um elevado número de macrófagos na última semana de gestação, a sua capacidade fagocitária está diminuída, provavelmente devido à menor atividade de opsonização, que, por sua vez, está relacionada com a diminuição de IgM (imunoglobulina M), cuja função é facilitar a fagocitose dos macrófagos e neutrófilos. Além disso a expressão do MHC II pelos macrófagos, nesta fase, está diminuída, o que resulta numa fraca resposta imunitária por parte dos linfócitos (Sordillo & Streicher, 2012).

Os neutrófilos são o principal tipo de célula encontrado no tecido mamário e no leite durante a fase inicial do processo inflamatório, constituindo cerca de 90% da população leucocitária presente numa situação de mastite. São as citocinas pró-inflamatórias libertadas pelos macrófagos que vão promover o recrutamento dos neutrófilos (figura 3C), que com a ajuda das L-seletinas vão penetrar através do endotélio no local da infeção, em que vão realizar a fagocitose e produzir radicais livres de oxigénio, péptidos antibacterianos com baixo peso molecular e defensinas, os quais vão contribuir para eliminar uma grande variedade de agentes patogénicos (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Durante o parto da vaca, o número de neutrófilos imaturos na corrente sanguínea aumenta, enquanto que os neutrófilos maduros no sangue e secreções mamárias são baixos. As funções desempenhadas por estas células vão ficar prejudicadas na altura do parto, sobretudo pela diminuição das células que expressam a adesão das L-seletinas (Sordillo & Streicher, 2012).

Se as bactérias sobreviverem, a infiltração de neutrófilos é substituída por linfócitos e monócitos. Os linfócitos têm a capacidade de reconhecer antígenos através de recetores de

membrana específicos, os quais definem as características imunológicas da especificidade, diversidade, memória. Existem linfócitos T e B, dentro dos linfócitos T destacam-se os CD4+ (T *helper*) e os CD8+ (T citotóxico).

Durante uma mastite, são os linfócitos T *helper* que prevalecem e são ativados em resposta ao reconhecimento do MHC II ao antígeno, feito por células tais como células B ou macrófagos. Vai ocorrer assim a produção de citocinas que podem provocar uma resposta do tipo celular ou humoral (Sordillo & Streicher, 2012).

Os linfócitos CD8⁺ têm função citotóxica, pois eliminam as células hospedeiras que expressam antígenos (em associação com o MHC classe I), além disso, são consideradas “decantadoras” pois eliminam células velhas ou danificadas e as suas secreções, cuja sua presença poderia aumentar a suscetibilidade da glândula mamária para uma infecção (Oviedo-Boyso et al., 2007).

A principal função dos linfócitos B é a de produzir anticorpos contra os agentes etiológicos.

As células NK fazem parte da resposta inata e conseguem destruir tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas, por esta razão são indispensáveis na prevenção de infecções (Oviedo-Boyso et al., 2007).

2.5.3. Fatores solúveis

Os fatores solúveis da resposta inata e específica representam uma importante linha de defesa dentro da glândula mamária.

As bactérias têm diferentes estruturas que constituem as suas paredes celulares e que são reconhecidas por receptores da membrana plasmática específicos. Essas estruturas são lipossacarídeos (LPS), peptidoglicanos (PGN) e ácido lipoteicoico (LTA), que constituem os padrões moleculares associados aos patogênicos (PAMP). Estes PAMPs são reconhecidos pelos receptores *toll-like* (TLR), que estão localizados nos endossomas. Os TLR4 reconhecem os LPS das bactérias gram-negativas (por exemplo, *E. coli*), por sua vez, o TLR2 está implicado no reconhecimento do LTA e PGN constituintes das bactérias gram-positivas. Esta interação entre TLRs e PAMPs vai desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias (Oviedo-Boyso et al., 2007). Existem uma variedade delas, como as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

A IL-1 β é produzida por monócitos/macrófagos e células epiteliais e durante a resposta inflamatória, vai promover o recrutamento de neutrófilos para o tecido lesado (figura 3C). Tem um papel de destaque em infecções provocadas por *E. coli* e *S. aureus*.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e está envolvida no choque séptico agudo que pode ocorrer numa mastite provocada por *S. aureus*. Vai promover a alteração de neutrófilos por monócitos.

A IL-8, uma quimioquina produzida pelos monócitos, linfócitos T e macrófagos, bem como células endoteliais e epiteliais. É bastante produzida durante uma infecção provocada por *E. coli*.

O TNF- α é produzido por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais, sendo a principal citocina produzida durante a fase inicial da infecção e responsável pelo choque endotóxico que ocorre em mastites clínicas agudas produzidas por *E. coli*.

A glândula mamária pode conter outros fatores solúveis de natureza não específica que podem atuar independentemente ou em associação com as imunoglobulinas (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Um desses fatores é a lactoferrina, uma glicoproteína ligante de ferro produzida pelas células epiteliais mamárias e que é encontrada nos grânulos dos neutrófilos. Ao sequestrar o ferro, a lactoferrina previne a multiplicação de microrganismos que sejam ferro dependentes, como é o caso dos coliformes (Ruegg et al., 2015). Durante a lactação, a concentração de lactoferrina é mais baixa do que a observada durante a involução da glândula e a inflamação (Sordillo & Streicher, 2002).

A lisozima é uma proteína bactericida presente no leite cuja função consiste na clivagem dos peptidoglicanos da parede de bactérias gram-positivas, assim como de outras membranas presentes nas bactérias gram-negativas (Sordillo & Streicher, 2002).

O sistema complemento está presente no soro e no leite, sendo uma parte importante nos mecanismos de defesa que a glândula mamária apresenta, podendo ser desencadeado de forma inata ou adaptativa. As proteínas do complemento são predominantemente produzidas por hepatócitos, e para além de ter como função o recrutamento de neutrófilos, também entram na opsonização e lise das bactérias. Todas as bactérias são sensíveis à ação opsonizante do complemento C3b e C3bi, e as bactérias gram-negativas não resistem à ação lítica do complemento, já o mesmo não acontece com as gram positivas, como *S. aureus* (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Os fatores solúveis principais da resposta específica são as Igs (imunoglobulinas) produzidas pelos plasmócitos. As concentrações de Igs são baixas num leite normal, mas aumentam em resposta a uma infecção intramamária, principalmente a IgG₂ (Ruegg et al., 2015) e durante a colostrogénese. A IgG₁, a IgG₂ e IgM podem atuar como opsoninas para facilitar a fagocitose dos neutrófilos e macrófagos. Pelo contrário, IgA não ajuda na opsonização mas induz a aglutinação das bactérias, prevenindo a sua propagação (Sordillo, 2005). A concentração de IgGs no soro das vacas é baixa na altura do parto e em particular, a falta de IgG₂ está associada com o aumento da incidência de mastites (Pyörälä, 2008).

Para além das citocinas já mencionadas, existem citocinas pertencentes à resposta adaptativa, como as interleucinas (IL-2, IL-12) e interferão gama (IFN- γ).

A IL-2 é produzida por linfócitos CD4⁺ e regula a imunidade adquirida, uma vez que, estimula o crescimento e diferenciação dos linfócitos B, aumenta a proliferação de timócitos, ativa as células NK e induz a ativação dos linfócitos T.

A IL-12, é um mediador entre a reposta inata e adquirida, ao regular a diferenciação dos linfócitos T (Oviedo-Boyso et al., 2007).

O IFN- γ é produzida por linfócitos CD4⁺/CD8⁺ e células NK como resposta a uma estimulação antigénica. Tem como funções, a ativação da resposta adquirida, bem como a produção de linfócitos T e de IL-12. Esta citocina também aumenta a capacidade de fagocitose dos neutrófilos em infeções bacterianas (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Os fatores estimulantes de colónias (CSF) são outro grupo de citocinas requeridas nos processos de diferenciação de células como os fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e linfócitos T. A sua presença aumenta a capacidade fagocitária e bactericida dos neutrófilos (Sordillo, 2005).

2.6. Patogenia

No geral, as mastites provocadas pelos microrganismos são caracterizadas por três etapas: **invasão**, **infeção** e **inflamação**. Na **invasão**, os microrganismos atravessam o canal do teto. Na **infeção**, estes agentes estabelecem-se dentro da cisterna da glândula, em que se multiplicam e espalham-se por todo o tecido da glândula mamária, dependendo da suscetibilidade do animal. Na fase inicial da infeção, os mecanismos de defesa inatos da glândula mamária atuam no sentido de debelar imediatamente a infeção.

A **resposta inflamatória** é caracterizada pelo aumento do número de células somáticas (atribuído principalmente aos neutrófilos) e pelo surgimento dos sinais clínicos (Oviedo-Boyso et al., 2007).

2.7. Etiologia

A maioria das mastites, clínicas ou subclínicas, são provocadas por uma bactéria (Royster & Wagner, 2015). No entanto também podem ser devido a leveduras, fungos e algas (Ruegg et al., 2015).

Os agentes patogénicos podem ser classificadas em agentes contagiosos, que são transmitidos de vaca para vaca por fomites durante a ordenha, e em agentes ambientais, cujo reservatório está no ambiente (Royster & Wagner, 2015).

De acordo com Ruegg et al. (2015) já foram isolados mais de 130 microrganismos causadores de mastites, contudo nesta revisão vai-se apenas abordar os principais agentes etiológicos.

Tabela 2-Principais agentes etiológicos de mastites em bovinos (adaptado de Guerrero et al., 2016 e Blowey & Edmondson, 2010)

Agentes contagiosos	Agentes ambientais
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ²
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> ³
<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella</i> spp.
	<i>Prototheca</i> spp.

^{2,3} A sua classificação não é unânime para alguns autores

2.7.1. Agentes contagiosos

2.7.1.1. *Staphylococcus aureus*

Estes microrganismos são cocos gram-positivos, coagulases positivos, geralmente hemolíticos. O reservatório primário é dentro da glândula mamária (Blowey & Edmondson, 2010c).

É a espécie bacteriana mais frequentemente isolada em casos de mastites bovinas e apresenta baixas taxas de sucesso terapêutico (Aslantaş & Demir, 2016). Este fenómeno é explicado pela resistência aos antimicrobianos através de algumas características que estas bactérias possuem, nomeadamente apresentarem mecanismos anti fagocitários, bem como a capacidade de sobreviver dentro dos neutrófilos e células epiteliais e induzir a apoptose (Ruegg et al., 2015). Algumas estirpes produzem também uma variedade de enzimas e endotoxinas que lesam as células da glândula mamária, resultando em fibrose e formação de abscessos. Também algumas estirpes produzem β -lactamase, conferindo resistência a antibióticos como a penicilina e amoxicilina (Aslantaş & Demir, 2016).

Outro mecanismo que afeta significativamente a eficácia do tratamento é o facto de certas estirpes formarem colónias aderentes ao tecido mamário, revestidas por biofilme, fazendo uma barreira contra fagócitos e antimicrobianos (Ruegg et al., 2015).

2.7.1.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae é um coco gram-positivo e beta-hemolítico, sendo que é um agente altamente contagioso e facilmente transmitido de vaca para vaca durante a ordenha (Blowey & Edmondson, 2010c).

Estes microrganismos raramente são isolados de amostras de leite individuais ou mesmo de amostras do tanque. As mastites provocadas por este agente são frequentemente subclínicas e, se não forem tratadas, podem persistir por meses ou anos (Ruegg et al., 2015). *Streptococcus agalactiae* adere às células epiteliais da glândula mamária e tem como localização primária os ductos. A produção de leite baixa quando os ductos ficam bloqueados com células e detritos (Ruegg et al., 2015).

A identificação de todos os quartos infetados no rebanho é de extrema importância quando tratamos uma mastite provocada por este agente. Se vacas infetadas não forem tratadas, vão servir de fonte de infeção para outros animais. Por essa razão, muitas vezes utiliza-se a terapia global, através da qual todos os quartos das vacas infetadas são tratados simultaneamente com a intenção de eliminar todas as infeções presentes na vacada (Owens & Nickerson, 2011).

2.7.1.3. *Mycoplasma* spp.

O *Mycoplasma* spp. é um agente contagioso que não é uma causa de mastite muito comum, estando descrito que a sua prevalência, dependendo do tamanho do rebanho, localização geográfica, pode variar (Fox, 2012). Por exemplo, para rebanhos com mais de 500 animais nos Estados Unidos, a prevalência pode rondar os 14 %, enquanto que para países europeus, como França e Bélgica, a taxa pode oscilar entre 1% e os 5% (Fox, 2012).

De entre as várias espécies existentes, *Mycoplasma bovis* é a causa mais frequente de mastite.

As colónias de *Mycoplasma*, ao contrário de outras bactérias são de crescimento lento (10 dias) e necessitam de requisitos específicos (10% de dióxido de carbono e 37°C) para que ocorra o seu desenvolvimento. Caso haja negligência no manuseamento das amostras, pode conduzir a resultados falso-negativos (Ruegg et al., 2015).

Esta bactéria é muito contagiosa, espalhando-se facilmente num grupo de animais infetado. Os animais podem apresentar os quartos inflamados e uma quebra muito acentuada na produção leiteira, sendo por vezes só libertado uma secreção aquosa. Apesar de o tratamento antimicrobiano ser eficaz contra *Mycoplasma* spp. ao inibir a síntese proteica, existe a necessidade de reforçar medidas de controlo tais como, ordenhar os animais infetados em último lugar e esse leite ser descartado, garantir uma boa higienização dos tetos na ordenha e, em último caso, o refugo dos animais (Blowey & Edmondson, 2010c).

2.7.1.4. *Corynebacterium bovis*

Da família *Corynebacteriaceae*, *Corynebacterium bovis* é o agente mais frequentemente associado a mastites bovinas, sendo um bacilo gram-positivo, catalase positivo e lipofílico.

Este agente contagioso é maioritariamente isolado no canal do teto, podendo causar IIM ocasionais que originam uma ligeira subida na CCS e um decréscimo na produção leiteira.

Apesar de ser transmitido de vaca para vaca durante a ordenha, uma boa prática de pré e pós dipping é, na maioria das situações, suficiente para controlar a propagação deste organismo (Ruegg et al., 2015).

2.7.2. Agentes ambientais

2.7.2.1. *Streptococcus dysgalactiae*

Esta espécie de estreptococos é um coco gram-positivo hemolítico (Blowey & Edmondson, 2010c), e embora sendo considerado como um agente ambiental, está evidenciada a sua transmissão de vaca para vaca, sendo também considerado um agente contagioso (Tiwari et al., 2013).

As vacas muito vezes são infetadas entre as ordenhas, quando os canais dos tetos entram em contacto com fezes ou em camas sujas, ou mesmo durante a ordenha, principalmente quando há uma má limpeza dos tetos (Biggs, 2009), sendo este agente frequentemente encontrado na pele dos tetos, especialmente quando a integridade desta foi comprometida.

Pode ser detetado em casos de mastite subclínica e clínica, sendo estes últimos geralmente esporádicos e relativamente fáceis de tratar. Todavia, algumas infeções podem tornar-se persistentes, resultando num aumento na CCS (Biggs, 2009). Esta persistência deve-se a certos fatores de virulência, bem como, à aderência e penetração nas células epiteliais da glândula que fazem com que esta bactéria permaneça por longos períodos, sem perder a sua viabilidade, evitando assim a ação dos antimicrobianos e dos mecanismos de defesa imunitária (O'Halloran et al., 2016).

Estes agentes etiológicos também podem ser isolados a partir das amígdalas, e, consequentemente, o ato de lambar pode ser um veículo de transmissão da infeção aos tetos. Este facto pode explicar a razão pela qual este agente é uma causa comum de mastite em novilhas. A irritação no teto associado com miíases ou frieiras, podem encorajar o animal a lambar os tetos e assim transmitir a infeção. É considerado um dos cinco agentes das chamadas mastites de verão e a mosca (*Hydrotea irritans*) é um veículo de transmissão (Neiwert et al., 2014).

2.7.2.2. *Streptococcus uberis*

Este agente patogénico é um coco gram-positivo não-hemolítico (Blowey & Edmondson, 2010c) e está associado em casos quer de mastites clínicas quer em subclínicas, bem como em vacas lactantes e secas (Montironi et al., 2016).

Apesar de ser inicialmente considerado um agente ambiental, existem segundo Collado et al (2016) certas estirpes classificadas como adaptadas ao hospedeiro, caracterizadas pela cronicidade das infeções e pela transmissão contagiosa dentro do rebanho.

Esta espécie é muito problemática devido ao facto de serem ubiqüitárias no ambiente da vacaria, sendo muitas vezes isoladas nos materiais que constituem as camas dos animais.

Junta-se a esse dado, a capacidade de *S. uberis* aderir às células do epitélio glandular e ter a capacidade de formar biofilme, tornando-se num importante fator de virulência. É assim, importante evitar que essa formação ocorra ao tratar este tipo de infeções intramamárias (Montironi et al., 2016).

2.7.2.3. *Staphylococcus coagulase negativo*

Este grupo de microrganismos são cocos gram-positivos e podem ser hemolíticos ou não-hemolíticos. Como exemplo deste tipo de espécie temos: *Staphylococcus xylosus*, *S. hyicus* e *S. epidermidis* (Blowey & Edmondson, 2010c).

Tradicionalmente, *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) são considerados agentes patogénicos de menor relevância. Contudo, a sua importância tem aumentado porque se tornaram um dos grupos de espécies mais frequentemente isolados no leite em muitas áreas em todo o mundo. SCN usualmente causam mastites subclínicas, resultando num aumento na contagem de células somáticas e, consequentemente, num decréscimo na qualidade do leite (Raspanti et al., 2016).

2.7.2.4. Coliformes

As bactérias coliformes são uma frequente causa de mastite clínica em bovinos de leite, em que mais de 80% dos casos é provocado por *Escherichia coli*. Outros coliformes como *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., e *Citrobacter* spp. também podem ser isolados (Suojala et al., 2013).

2.7.2.4.1. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, podendo ser hemolítica ou não-hemolítica, dependendo da estirpe (Blowey & Edmondson, 2010c).

As infecções intramamárias com *E. coli* são a causa mais frequente de mastites clínicas em vacadas com bom manejo. Uma grande proporção de infecções por este coliforme resulta em sinais clínicos ligeiros ou moderados. Contudo, aproximadamente 10% de IIM por *E. coli* conduzem a sinais mais severos e até à morte do animal (Sipka et al., 2016).

Estas bactérias são frequentemente excretadas nas fezes e os materiais orgânicos que constituem as camas são suporte para o crescimento destes coliformes, especialmente se existem as condições de humidade e temperatura ideais.

Depois de a bactéria infetar a glândula, existe uma rápida multiplicação, mas ao contrário de outros microrganismos, não vão aderir ou invadir as células epiteliais.

A capacidade em crescer nas secreções mamárias e de libertar a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula termoestável que se encontra nas paredes celulares das bactérias é crucial na patogenicidade da mastite (Burvenich et al., 2003). Quanto mais aumentar o número de bactérias na glândula, mais LPS está disponível e assim mais rápida será a resposta inflamatória e a doença clínica ocorre (Schukken et al., 2011).

As bactérias gram-negativas utilizam nutrientes do leite para crescerem e multiplicarem-se. Uma clara vantagem por parte delas é a utilização de lactose como fonte de energia proveniente do leite (Schukken et al., 2011).

2.7.2.4.2. *Klebsiella* spp.

Relativamente a este género de coliformes, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* são as duas espécies mais comuns em casos de mastites. Ao contrário da *E. coli*, as IIM provocadas por estes agentes são muitas vezes mais duradouras e acompanhadas de um aumento significativo do número de células somáticas. A infeção inicial pode ser ambiental, mas também pode haver transmissão entre vacas durante os períodos da infeção subclínica. A utilização de serradura em camas pode estar implicada em surtos de mastites por *Klebsiella* spp., mas este agente pode proliferar rapidamente em outros materiais e segundo Biggs (2009), num estudo realizado, 80% das amostras recolhidas em vacas deram positivo para esta bactéria.

2.7.2.4.3. *Serratia* spp.

As espécies mais comuns de *Serratia* isoladas em mastites bovinas são a *S. marcescens* e *S. liquefaciens* (Schukken et al., 2012). As infeções por este agente podem ocorrer em

qualquer altura do ciclo de lactação, contudo segundo Ruegg (2015) citando um estudo longitudinal de Todhunter et al (1991) , 48% das IIM por este coliforme ocorriam na primeira fase do período seco e 31% durante a segunda fase, e apenas 21% ocorriam durante a fase de lactação.

Ao contrário de outras bactérias gram-negativas, as infeções subclínicas são muito mais frequentes em *Serratia* spp. e são muito mais persistentes e menos patogénicas, o que pode ser explicado por uma menor estimulação do sistema imunitário por estas bactérias (Ruegg et al., 2015).

Estas bactérias são ubíquitas no ambiente, podendo ser isolada nos materiais constituintes das camas e em fezes e também existe evidências epidemiológicas que surtos de *Serratia* spp. estão associados a desinfetantes dos tetos contendo clorexidina.

A terapia com antimicrobianos é bastante ineficiente, sendo a maioria dos casos de resolução espontânea (Schukken et al., 2012).

2.7.2.5. *Prototheca* spp.

Estes microrganismos são algas sem clorofila, unicelulares e de distribuição universal. A *Prototheca* spp. pode existir no ambiente de explorações que não tenham historial de mastites por este agente, estando presente essencialmente, em zonas húmidas em que se concentre matéria orgânica, como bebedouros, lama e estrume (Bexiga et al., 2002). Um fator de risco de infeção por *Prototheca* spp. pode ser a má execução da técnica de infusão intramamária de antimicrobianos ou de selantes.

Das espécies conhecidas, *P.wickerhamii* e *P.zopfii* são consideradas as mais patogénicas.

Em bovinos leiteiros podem provocar mastite crónica, subclínica e, menos frequentemente clínicas, com a eliminação do agente no leite a ocorrer de forma intermitente, tornando difícil a deteção entre todos os animais infetados (Bexiga et al., 2002).

Apesar de muitas infeções serem de origem ambiental, também podem ser por transmissão de vaca a vaca durante a ordenha.

O tratamento não é recomendado, sendo a *P.zopfii* resistente à antibioterapia e a infeção pode persistir durante o período seco (Ruegg et al., 2015).

2.8. Classificação e sinais clínicos

Clínicamente, falamos em duas formas de mastites: **clínica** e **subclínica**.

A **mastite clínica** é aquela em que é possível visualizar alterações do aspeto do leite, do úbere e/ou de ambos. Os sinais clínicos da mastite são resultado da inflamação e podem

incluir alterações no leite, em que este pode estar aquoso ou mais espesso, e/ou descolorado com sangue, pus, flocos ou coágulos. As vacas com mastite clínica podem também apresentar sinais de inflamação, tais como tumefação, rubor ou dor no quarto afetado e em alguns casos a mastite pode originar uma infecção sistêmica, com sinais clínicos como: toxemia, estase ruminal, anorexia, febre, desidratação, fraqueza, inapetência ou agalactia (Royster & Wagner, 2015). Os casos clínicos são classificados de acordo com o seu grau de severidade, podendo ser ligeiro, moderado ou severo (tabela 3).

Em casos muito severos pode existir zonas do teto com gangrena ou desenvolverem-se abscessos no tecido glandular (Radostits et al., 2007).

Comparativamente às mastites subclínicas, uma grande proporção de casos clínicos é provocada por bactérias gram-negativas. Tal como qualquer infecção bacteriana, muitos casos de mastites, ocorrem como um síndrome, com os quartos infetados a alternarem entre um estado clínico e subclínico (Ruegg et al., 2015).

Tabela 3-Sistema de classificação de mastites clínicas (Adaptado de Royster&Wagner,2015)

Classificação	Descrição
1.Ligeiro	Leite anormal (p.e., coágulos, flocos, aquoso)
2.Moderado	Leite anormal e sinais de inflamação no úbere (p.e., edema, calor, rubor e dor)
3.Severo	Sinais sistémicos (p.e., febre, desidratação, fraqueza e inapetência)

Embora o tratamento das mastites seja maioritariamente dirigido para as mastites clínicas, muitos casos de mastites são **subclínicos**. Uma mastite subclínica é caracterizada por não existirem alterações visíveis no aspeto do leite, sendo esta geralmente diagnosticada através do número elevado de células somáticas presentes no quarto afetado. A duração da fase subclínica da IIM vai depender do agente etiológico, sendo que em muitas explorações, uma grande proporção de mastites subclínicas são provocadas por microrganismos gram-positivos, em que entre 25 a 35% de vacas com mastite subclínica crónica podem vir a evoluir para uma situação em que apresentem sinais clínicos.

Os animais com infeções subclínicas apresentam quebras de produção e servem como reservatório, aumentando assim a exposição para as vacas saudáveis (Ruegg et al., 2015).

2.9. Diagnóstico

A deteção de um caso de uma mastite clínica é quase sempre feita pelo ordenhador, o qual, ao rejeitar os primeiros jatos para o chão ou para um copo de fundo preto observa a alteração do aspeto do leite (Vieira, 2010).

Deve ser realizado um exame clínico de rotina, com a observação e palpação dos quartos para detetar possíveis alterações de tamanho e consistência bem como a presença de sinais de dor. Todos os quartos devem ser inspecionados e palpados para avaliar a existência de lesões nos tetos. Também os linfonodos retromamários devem ser palpados para avaliar a possível existência de adenomegalia.

A palpação e inspeção do úbere pode também permitir a deteção de fibrose, sinais de inflamação e de atrofia do tecido mamário (Radostits et al., 2007).

A contagem de células somáticas (CCS) no leite é uma importante ferramenta de diagnóstico para as mastites subclínicas, considerada como critério para a avaliação do estado do úbere (Cardozo et al., 2015). As células somáticas presentes no leite são constituídas na sua maioria (75%) por leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eritrócitos) que aumentam na glândula mamária em resposta a uma lesão ou infeção, e por células epiteliais de descamação (cerca de 25%). Habitualmente, no leite produzido por uma glândula mamária normal, a contagem de células somáticas (CCS) é menor que 100.000 células/ml (Sharma et al., 2011). Uma CCS superior a 200.000 células/ml numa amostra de leite (de todos os quartos) é usualmente indicador que um ou mais quartos estão infetados.

O teste mais comum para a deteção de mastites subclínicas na vacaria é o Teste Californiano de Mastites (TCM) (Royster & Wagner, 2015). Este é um método rápido, simples e muito barato, em que consiste na recolha de uma pequena quantidade de leite de cada quarto (os primeiros jatos devem ser rejeitados) para um dispositivo apropriado (figura 4). Esta espécie de “raquete” possui uma marca que acerta a quantidade de leite a cerca de 2 ml. De seguida é adicionado a cada amostra de leite, a mesma quantidade de um detergente contendo um indicador de pH. O reagente vai provocar a lise da parede celular e nuclear das células somáticas, libertando o ADN que vai reagir com o produto e assim formar um gel. O grau do gel formado é classificado e associado à CCS presentes na amostra (tabela 4) (Godden et al., 2017).

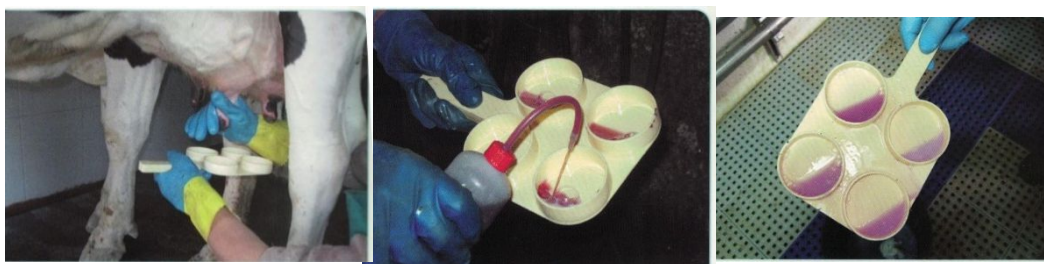


Figura 4-Realização de um TCM (Adaptado de Guerrero et al, 2016)

Tabela 4-Leitura e interpretação do TCM (Adaptado de Biggs,2009)

Resultado TCM	Descrição	CCS (células/ml)
Negativo	A mistura mantém-se líquida, sem evidência de geleificação	<200.000
Vestígio	Geleificação ligeira que desaparece com o movimento contínuo	200.000-500.000
1	Formação de geleificação, mas nenhuma tendência à formação de gel	400.000-1.500.000
2	A mistura engrossa imediatamente e move-se em direção do centro	800.000-5.000.000
3	Formação de gel e a superfície torna-se convexa	>5.000.000

Embora este teste seja bastante prático e fundamental para a deteção de mastites, os resultados obtidos de vacas recentemente paridas são de difícil interpretação, não se devendo utilizar nos primeiros quatro dias de lactação (Lam et al., 2009).

Para além do aumento do número de células somáticas presentes no leite, ocorrem alterações na composição do leite devido à resposta imunitária à infeção. Essas mudanças podem ser usadas como deteção de mastites subclínicas. Por exemplo, durante uma mastite, a concentração de K^+ vai diminuir e Na^+ e Cl^- aumenta (Teste de condutividade elétrica). Também o aumento da atividade da enzima N-acetil-b-D-glucosaminidas (NAGase) e do pH no leite (pH normal varia entre 6.5-6.7) são indicadores de uma possível infeção (Ruegg et al., 2015).

Para a mensuração do número de células somáticas de forma direta, é recolhida uma amostra de leite de todos os quartos da vaca e é enviada para laboratório. No diagnóstico laboratorial, a CCS pode ser determinada através da observação microscópica direta ou de forma mais comum, através do *Fossomatic* (figura 5), um aparelho baseado na tecnologia de citometria de fluxo, com base na quantidade de DNA (Lam et al., 2009).



Figura 5-Fossomatic

Os valores da CCS, podem ser por vezes de difícil interpretação, uma vez que este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores, tais como a idade, frequência da ordenha, intervalo entre ordenhas, variações sazonais, fase da lactação, parto, stress e fração da amostra utilizada (Lam et al., 2009).

Depois de detetada a mastite, o passo seguinte deve ser o diagnóstico do agente etiológico responsável pela infeção.

Muitas vezes os sinais clínicos podem ser sugestivos de certos agentes, mas é impossível diagnosticar a etiologia baseado apenas na aparência do leite, no úbere ou na vaca (Ruegg et al., 2015).

As amostras de leite podem ser retiradas de cada quarto (amostra individual do quarto) ou então uma recolha combinada de todos os quartos numa só amostra (amostra individual do animal).

Para se fazer a recolha, deve-se utilizar uma técnica assética, de modo a minimizar a possibilidade de contaminação da amostra. Normalmente a mastite é causada por um único organismo, o isolamento de mais do que três agentes, pode indicar que a amostra foi contaminada (Ruegg et al., 2015).

As amostras devem conter cerca de três a cinco ml, devendo ser logo refrigeradas a 4°C, ou colocadas com placas de gelo, ou em caso de não ser possível o seu envio para o laboratório nas primeiras 24 horas, devem ser congeladas (Ruegg et al., 2015).

No laboratório, os meios de cultura contêm os nutrientes necessários para o desenvolvimento bacteriológico e são colocados em incubadoras com temperatura e condições atmosféricas ideais. Os meios de cultura geralmente utilizados são os de agar sangue (5%), em que é inoculado entre 10 a 100 µl de leite. O aumento do volume inoculado pode permitir o isolamento de bactérias que excretam em baixas concentrações, como o *S. aureus* e *E. coli*.

A identificação do agente é baseada nas características fenotípicas das colônias e do resultado de testes laboratoriais adicionais.

Quando as amostras advêm de casos de mastites clínicas, o meio agar MacConkey é usado para facilitar a rápida identificação de gram-negativos e microrganismos fermentadores de lactose (coliformes) (Ruegg et al., 2015).

Existem ainda outros métodos para determinar quais os agentes responsáveis pelos casos de mastites, entres os quais as técnicas moleculares.

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) permite diferenciar estirpes dentro das espécies de bactérias, o que é de extrema importância pois muitas estirpes estão relacionadas com diferentes fatores de virulência, epidemiológico e taxas de sucesso terapêutico (Lam et al., 2009).

Após a identificação do agente etiológico, a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) é muito importante para escolher um antimicrobiano ao qual os microrganismos sejam sensíveis. Este tipo de teste pode ser determinado por métodos de diluição ou difusão. O método de difusão (Kirby-Bauer) é o mais utilizado em rotina de laboratório. Neste tipo de teste, são colocados discos impregnados com quantidades conhecidas dos antibióticos a testar em meios de cultura adequados, seguindo um método standardizado e usado universalmente (Wagner & Erskine, 2013).

A determinação da sensibilidade é feita através da medição em milímetros do diâmetro do halo de inibição de crescimento, em volta do respetivo disco, dos agentes patogénicos isolados. É importante ter em conta que um diâmetro maior não significa que o antibiótico é mais eficaz, pois cada substância ativa tem uma concentração mínima inibitória (CMI) diferente, assim como a sua solubilidade e difusão no meio (Constable & Morin, 2003). Mediante da interpretação dos resultados, os microrganismos podem ser sensíveis, ter sensibilidade intermédia ou serem resistentes aos antibióticos (Wagner & Erskine, 2013).

Apesar da sua importância, tem de se ter em consideração que o TSA tem um valor limitado no auxílio da decisão terapêutica para as mastites, pois os resultados em laboratórios podem não ser coincidentes com a prática clínica. Para isso, segundo Wagner & Erskine (2013), uma boa abordagem pode ser a implementação de um plano terapêutico com uma gama de antibióticos selecionados para cada exploração e periodicamente avaliar-se a sua eficácia.

2.10. Tratamento de mastites durante a lactação

O tratamento de mastites pode ser realizado durante a lactação ou no período seco.

Geralmente é o ordenhador o primeiro a reconhecer um caso de mastite, e desde que devidamente orientado pelo médico veterinário, pode ser o próprio a implementar o

tratamento. O animal deve ser separado do restante grupo, passando-a para o último grupo a ser ordenhado, o chamado grupo “hospitalar” (Blowey & Edmondson, 2010d).

Os objetivos do tratamento são o de tratar a infecção, promover uma rápida recuperação do animal, salvar o quarto afetado e, claro, salvar a vaca. A prioridade desses objetivos muda consoante a gravidade da infecção. Segundo Roberson (2012), o primeiro passo no controlo de um caso de mastite clínica é determinar o seu grau de severidade, que pode ser ligeiro, moderado ou severo. Nessa avaliação devem ser incluídos parâmetros objetivos como a temperatura rectal, grau de desidratação, contração ruminal e avaliação clínica do úbere e aspeto do leite. Uma vez determinado o grau de severidade, o passo seguinte seria a realização de uma cultura microbiana e TSA, mas num caso severo o tratamento deve ser iniciado imediatamente.

Geralmente, a maioria dos casos de mastites clínicas severas são provocadas por coliformes. Roberson (2012) citando um estudo de Erskine et al (2002), revelou que 53,8% dos casos severos foram causados por esses microrganismos. Isto leva a que a cultura microbiana e TSA devem ser sempre realizados, não só nos casos ligeiros e moderados, mas também nas mastites severas de modo a garantir se o antibiótico utilizado é o mais indicado (Roberson, 2012).

Para descrever as bases do tratamento de mastites clínicas pode-se utilizar o seguinte acrónimo: FANO, em que F corresponde a fluidos, A de antibióticos, N=AINE'S e O de outros medicamentos que possam auxiliar (Roberson, 2012).

2.10.1. Antibioterapia em vacas em lactação

Tendo em conta que as mastites são a principal razão para o uso de antibióticos em vacarias de leite, aliado ao facto de existir um aumento de resistências antimicrobianas, é imperativo que os produtores sigam as melhores práticas ao usar antibióticos de uma forma seletiva e criteriosa (Royster & Wagner, 2015).

O tratamento antimicrobiano deve ser reservado para casos que provavelmente vão ser benéficos. Por exemplo, mastites causadas por *Streptococcus agalactiae* devem ser sempre tratadas, pois este organismo é considerado altamente responsivo a qualquer droga administrada (Wagner & Erskine, 2013).

Os médicos veterinários, no momento da decisão terapêutica devem ter em consideração aspetos como a idade do animal, o seu histórico de infeções, o número de CCS anteriores, o número de quartos infetados. Animais que estão numa fase avançada de lactação e não-gestantes, que apresentem outras doenças como afeções podais e que não tenham uma elevada produção leiteira, devem ser candidatas a um potencial refugio, ao invés de serem tratadas (Royster & Wagner, 2015). Ainda existe também a possibilidade de muitas

infecções serem eliminadas naturalmente (Blowey & Edmondson, 2010d), bem como muitos microrganismos não serem suscetíveis a nenhum antimicrobiano, como *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella* spp. ou *Candida* spp., ou no caso de mastites subclínicas, que podem ser tratadas durante o período seco.

Depois de analisada cada situação, e sendo a opção o tratamento antimicrobiano da mastite, deve-se escolher qual o fármaco, com base no seu espectro de ação, na dose recomendada, duração do tratamento, intervalo de segurança e via de administração (Wagner & Erskine, 2013).

A glândula mamária é um alvo difícil para os antimicrobianos. A penetração das substâncias no leite quando administradas por via parenteral ou a absorção e distribuição ao longo da glândula quando infundidas por via intramamária depende das características farmacocinéticas do medicamento, nomeadamente a sua lipossolubilidade, grau de ionização e grau de ligação às proteínas séricas e do úbere. Também as propriedades farmacodinâmicas têm de ser levadas em conta, pois o leite não deve interferir com a atividade antimicrobiana e a seleção de uma substância com um valor mais baixo da concentração inibitória mínima (CIM) é preferível em casos de mastites tratadas pela via sistêmica. Por fim, o antibiótico utilizado deve ter uma ação mais bactericida do que bacteriostática, pois caso o animal esteja com o seu sistema imunitário comprometido, a utilização de um bacteriostático pode não ser suficiente (Pyörälä, 2009).

A terapêutica antimicrobiana de mastites pode assim ser realizada por via intramamária, via sistêmica ou uma associação entre as duas. Nesta decisão, a escolha pode depender do agente em questão. Os estreptococos permanecem na cisterna do leite, mas por exemplo, o *S. aureus* penetra nos tecidos da glândula mamária e provoca infecções mais profundas (tabela 5) (Pyörälä, 2009).

Tabela 5-Distribuição dos agentes patogénicos na glândula mamária (Adaptado de Pyörälä, 2009)

	Leite/ductos	Tecido mamário	Vaca (sangue)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	---	---
Outros estreptococos	+++	+	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	---
SCN	+++	---	---
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	---	++	+++
Coliformes	+	--	+++

A via mais comum na administração de antimicrobianos em mastites é a via intramamária. Esta via tem como vantagens permitir a existência de concentrações muito elevadas no leite e o antibiótico ser diretamente administrado no quarto afetado (Pyörälä,

2009). Em mastites ligeiras ou moderadas, é normalmente utilizado um fármaco por via intramamária.

Uma combinação de antibióticos por via parenteral e intramamária pode aumentar a eficácia antibacteriana e consequentemente a taxa de sucesso terapêutico. Por exemplo, segundo Gruet et al (2001) 75% dos quartos infectados por *S. aureus* ficaram curados 10 dias após o uso de espiramicina aplicado por via intramuscular e intramamária.

O tratamento sistêmico pode estar indicado quando o parênquima da glândula está bastante inflamado, fazendo com que o sistema de ductos esteja comprimido ou bloqueado por secreções inflamatórias e detritos celulares, impedindo a infusão do antibiótico via intramamária (Gruet et al., 2001).

Também em casos de mastites severas, em que são evidentes sinais clínicos sistêmicos como a febre ou depressão, bem como o leite anormal e inflamação do úbere, a administração de antibióticos via sistêmica deve fazer parte da terapia, conjuntamente com a terapia de suporte, abordada mais à frente. Apesar de este tipo de mastite ser provocada frequentemente por microrganismos coliformes (por exemplo, *E. coli* e *Klebsiella* spp.), e não tendo resultados bacteriológicos, a escolha do fármaco deve ter em conta também a presença de gram-positivos. Quando as mastites são provocadas por coliformes, muitas vezes os sinais clínicos só aparecem depois do pico do número dessas bactérias ter sido atingido, devendo os antimicrobianos combaterem a endotoxemia provocada pelas endotoxinas (Wagner & Erskine, 2013).

Em Portugal, e depois de consultada a lista atualizada de medicamentos veterinários autorizados, existem vários produtos disponíveis para vacas em lactação com diferentes princípios ativos de diferentes famílias (tabela 6).

Tabela 6-Famílias de antimicrobianos intramamários para tratamento durante a lactação em Portugal (adaptado de Marques,2008)

Famílias de antimicrobianos	Substância ativa
Beta-lactâmicos	
Penicilinas	
Penicilinas naturais	benzilpenicilina, penetamato
Isoxazolpenicilinas	ampicilina, amoxicilina
Aminopenicilinas	cloxacilina, nafcilina
Cefalosporinas	
Primeira geração	cefalexina, cefazolina
Terceira geração	cefoperazona
Quarta geração	cefquinoma
Aminoglicosídeos	dihidroestreptomicina, gentamicina, neomicina, frameticina
Lincosamidas	lincomicina, pirlimicina
Sulfonamidas+trimetoprim	sulfadiazina+trimetoprima

2.10.1.1. Beta-lactâmicos

Na família dos antibióticos beta-lactâmicos, só as penicilinas e as cefalosporinas estão indicadas no tratamento de mastites. Os antibióticos beta-lactâmicos são considerados bactericidas e têm como mecanismo de ação, a inibição da atividade das penicilina-*binding proteins* (PBPs), enzimas que são essenciais para a síntese da parede bacteriana. A diferença do espectro de ação deste tipo de antimicrobianos prende-se pela afinidade que cada um tem para as PBPs, pela ausência ou pela maior ou menor capacidade de resistência à inativação pelas β -lactamases e pela maior ou menor capacidade em penetrar na parede celular das bactérias (Prescott 2013a).

Um dos primeiros antibióticos beta-lactâmicos a serem desenvolvidos para administração intramamária foi a penicilina G. Este fármaco é eficiente contra muitos estreptococos e estafilococos não produtores de penicilinase (Prescott 2013a), todavia não é eficiente contra a maioria das bactérias gram-negativas. Para colmatar as limitações da penicilina G foram desenvolvidas penicilinas semissintéticas, como as isoxazolpenicilina (penicilinas anti-estafilocócicas), as aminopenicilinas e as cefalosporinas.

As penicilinas anti-estafilocócicas, como a cloxacilina e nafcilina, são resistentes à penicilinase produzida por *Staphylococcus aureus*, estando assim indicadas no tratamento deste agente patogénico, bem como de outros estafilococos e estreptococos (Prescott,2013a).

As aminopenicilinas, como a amoxicilina e a ampicilina apesar de serem menos ativas contra gram-positivos do que a penicilina G, são efetivas contra enterobactérias como a *E. coli*. Contudo, o aumento de resistências tem reduzido a eficácia destes fármacos, daí estarem normalmente associados a um inibidor das β -lactamases, como o ácido clavulâmico.

A subfamília das cefalosporinas, é classificada por gerações, havendo quatro, sendo que a cada nova geração, existe uma diminuição na atividade contra bactérias gram-positivas e um aumento de atividade contra gram-negativas e aumento do espectro de ação e da resistência às enzimas β -lactamases.

Nas cefalosporinas de primeira geração disponíveis, a cefalexina, cefapirina e cefazolina que são geralmente ativas contra estafilococos e estreptococos, por vezes também tem ação contra Enterobactérias como *E. coli* e *Klebsiella* spp. (Prescott,2013b).

Como cefalosporina de terceira geração, a cefoperazona é resistente à maior parte das β -lactamases, é ativa contra as enterobactérias resistentes às cefalosporinas de primeira e segunda geração (Prescott,2013b).

A quarta geração, representada pela cefquinoma, é caracterizada pela boa atividade contra bactérias gram-positivas e negativas (Prescott, 2013b).

2.10.1.2. Aminoglicosídeos

Neste grupo de medicamentos temos a estreptomicina, a neomicina, gentamicina e a frameticina. Todas estas moléculas têm como mecanismo de ação a ligação à subunidade 30S ribossomal da bactéria, interrompendo a síntese proteica. Este processo conduz a alterações na permeabilidade da membrana celular, resultando em lise celular (Dowling,2013).

Os aminoglicosídeos têm atividade bactericida, sendo muito ativos contra a maioria dos coliformes e efetivos contra os estafilococos produtores de β -lactamases (Blowey & Edmondson, 2010d).

Como têm pouco poder de penetração no tecido mamário por via intramamária, geralmente são associados a outra substância como o caso de uma penicilina (Blowey & Edmondson, 2010d).

2.10.1.3. Lincosamidas

As lincosamidas inibem a síntese proteica através da ligação à subunidade 50S ribossomal bacteriana, impedindo a translocação durante a fase de tradução (Giguère,2013). Podem apresentar atividade bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração da substância, do tipo de bactéria e da inoculação da bactéria (Guigère,2013).

Nesta família temos a pirimicina, que é muito efetiva contra gram-positivas e tem particularmente boa atividade contra *S. aureus*, podendo ser usada como terapia mais extensiva (administrada durante cinco a oito dias) em casos de mastites crônicas provocadas por essa bactéria (Oliver et al., 2003).

2.10.1.4. Sulfonamidas+trimetoprim

As sulfonamidas possuem atividade bacteriostática, pois impedem o desenvolvimento bacteriano por falta de ácido fólico. Assim sendo, estes antimicrobianos atuam como anti-metabolitos, ao competirem com o ácido p-aminobenzóico, um fator indispensável para a síntese de ácido fólico pela ligação com a enzima dihidropteroato sintetase, a enzima responsável pela catalisação da reação que origina o ácido dihidropteróico, essencial para a formação de ácido fólico (Prescott,2013c).

O trimetoprim vai interferir com a redução do ácido dihidrofólico em ácido tetrahidrofólico, por inibição competitiva com a enzima dihidrofolato redutase.

As sulfonamidas quando combinadas com trimetoprim exibem atividade bactericida contra gram-positivos e gram-negativos (Prescott, 2013c).

2.10.2. Resistências antimicrobianas no tratamento de mastites

Como já referido, atualmente a medicina veterinária, tal como a humana, depara-se com um grave problema em relação à pressão de seleção sobre estirpes resistentes a antimicrobianos.

O desenvolvimento das resistências antimicrobianas nas mastites revela três aspetos importantes. O primeiro prende-se com a redução da eficácia no tratamento, no controlo da doença e da produtividade, em que em alguns casos, vacas com mastites crónicas podem ser prematuramente refugadas. O segundo ponto é o potencial risco de transmissão de bactérias resistentes para os humanos via produtos alimentares, uma vez que, apesar de o leite de vacas com mastites clínicas ser descartado, em casos de infeções latentes, essas bactérias podem estar presentes no tanque. Em terceiro, o risco de transmissão de genes de resistência a outros microrganismos, que poderão vir a infetar humanos ou animais (Rocha et al., 2014).

A organização mundial de saúde (OMS) considera as resistências antimicrobianas uma ameaça global urgente e foram identificadas várias estratégias para reduzir este problema. Na comunidade europeia já existem planos de vigilância que incluem a monitorização da resistência antimicrobiana na medicina veterinária como uma das ações chave. Também a agência europeia de medicina (EMA) definiu várias ações desde o ano de 2016 até 2020 para garantir o uso responsável de antibióticos nos animais.

Ter acesso aos dados atuais de suscetibilidade dos diferentes antimicrobianos permite ajudar o médico veterinário na escolha do medicamento adequado para o tratamento de mastites, em particular numa terapia iniciada antes de realizada uma cultura bacteriológica e um TSA (de Jong et al., 2017).

Na Holanda, a nova política de uso responsável de antibióticos, em que todas as administrações são registadas e monitorizadas, assim como restrições ao uso de segundas e terceiras opções de antimicrobianos, bem como a proibição do uso de medidas profiláticas como o uso de antibioterapia de secagem a todas as vacas fez com que a dose diária de antibiótico por animal por ano diminuísse de 5,0 em 2010 para 3,0 e 2,3 em 2013 e 2014, respetivamente (Santman-Berends et al., 2016).

Através de um programa europeu de monitorização da suscetibilidade antimicrobiana, a VetPath foi possível determinar os padrões de resistência aos antibióticos nos principais agentes etiológicos isolados em casos de mastites (de Jong et al., 2017).

O último estudo foi realizado entre 2009 e 2012 em nove países, não estando incluindo Portugal. Desse estudo, os coliformes demonstraram uma resistência moderada às tetraciclina e alta à cefapirina (no caso de *E.coli*), sendo a resistência a outros beta-lactâmicos muito baixa (ceftiofur) ou baixa (amoxicilina com ácido clavulânico, cefalezina, cefalónio). As estirpes de *S. aureus* e SCN foram suscetíveis à maioria dos antibióticos, com exceção da penicilina, enquanto que as estirpes de *S. uberis* foram suscetíveis para os β -lactâmicos, embora 35,6% tenham apresentado sensibilidade intermédia para a penicilina. Para a eritromicina 20,2% apresentaram resistência e 36,7% para a tetraciclina.

Por fim, *S. dysgalactiae* também apresentou resistência à eritromicina (13,7%) e à tetraciclina (20%).

Comparativamente com o primeiro estudo realizado pelo mesmo organismo, verificou-se uma diminuição nos níveis de resistência por parte da penicilina (de Jong et al., 2017).

Apesar de Portugal não estar incluído no estudo mencionado, em 2014 foi publicado por Rocha et al., um trabalho sobre a evolução dos níveis de resistência de alguns antibióticos utilizados no país nos principais agentes isolados em mastites. Comparativamente com o estudo anterior mencionado verificou-se algumas diferenças, em que os resultados obtidos indicam um aumento nos níveis de resistência de certos antimicrobianos destacando-se a tendência para a resistência por parte de quase todos os agentes para a cloxacilina. Este facto pode ser explicado por este β -lactâmico ser muito utilizado tanto em tratamento de infeções intramárias durante a lactação e de secagem.

Em Portugal, foi implementado um plano de ação nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais iniciado no dia 1 de janeiro de 2014 com duração de cinco anos. Segundo os dados das vendas de antibióticos por parte da EMA, em Portugal já existe uma tendência na diminuição de vendas de medicamentos (European Medicine Agency, 2016).

2.10.3. Fluidoterapia

A fluidoterapia é provavelmente a consideração terapêutica mais importante em casos de mastites severas. Os fluidos e os eletrólitos são necessários para ajudar a proteger os rins e outros órgãos dos efeitos tóxicos causados pela administração de alguns antibióticos (por exemplo, tetraciclina) e anti-inflamatórios (p.e, flunixin meglumina), bem como para compensar a hipovolémia e endotoxémia (Roberson, 2012).

Muitas vacas com mastite clínica, principalmente as severas, apresentam um balanço ácido-base normal ou alcalose metabólica.

Os fluidos podem ser administrados via oral ou intravenosa. A via oral é a menos cara e a mais adequada para animais com um grau de desidratação ligeiro ou moderado (inferior a 8%). Os fluidos orais devem ser hipotónicos ou isotónicos e devem conter sódio para criar um

gradiente osmótico entre o fluido ruminal e o sangue, permitindo uma boa absorção dos fluidos e eletrólitos. Uma vaca com 600 kg, com um grau de desidratação de 6% necessita de cerca de 36 litros para repor esse déficit (Ruegg et al., 2015).

Contudo, a fluidoterapia oral é insuficiente em casos de uma desidratação severa. O lactato de Ringer, uma solução isotónica, ligeiramente acidificante que contém concentrações fisiológicas de sódio, cloreto, potássio e cálcio é o fluido intravenoso de escolha para uma rápida ressuscitação de uma vaca adulta (Roberson, 2012).

2.10.4. Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios esteróides como a prednisona e prednisolona podem ser efetivos no controlo da toxémia, inflamação e choque, mas não podem ser utilizados mais do que dois a três dias. Isto deve-se ao facto de estes fármacos poderem fazer imunossupressão e de induzirem a um parto prematuro ou aborto, retenção de membranas fetais e infeção uterina se utilizados no último terço de gestação (Owens & Nickerson, 2011).

Os anti-inflamatórios não esteróides, como a flunixin meglumina podem ser utilizados no tratamento de mastites clínicas em que vão auxiliar na redução dos sinais de inflamação, contra o choque endotóxico e na diminuição da temperatura do animal (Biggs, 2009). Os AINE's não provocam imunossupressão, mas podem provocar ulcerações no abomaso e lesões renais (Ruegg et al., 2015).

2.10.5. Ocitocina e aumento da frequência da ordenha

A ocitocina pode ser considerada como adjuvante no tratamento de mastites clínicas agudas. Acredita-se que a realização de múltiplas ordenhas (seis a oito vezes por dia), seguindo-se da administração de ocitocina exógena cause uma contração adicional das células mioepiteliais do tecido mamário infetado e inflamado, em que resulta um aumento da expulsão de coágulos, bactérias, produtos inflamatórios e toxinas (Owens & Nickerson, 2011). Contudo, Ruegg et al (2015) referem que vacas tratadas com este método apresentam uma alta taxa de recorrência de mastites clínicas, particularmente por estreptococos ambientais. Aliado a isto, a administração de ocitocina e a realização de ordenhas mais frequentes em tetos dolorosos devem ser evitados por razões de bem-estar animal.

2.11. Período Seco

O período seco de uma vaca ou de não-lactação é uma fase em que ocorrem alterações anatómicas, fisiológicas e metabólicas em vários sistemas do organismo, incluindo a glândula

mamária (Petzer et al., 2009). A duração ótima deste período tem sido alvo de discussão, sendo o período de 51 a 60 dias, o tradicionalmente recomendado. Contudo, os produtores tendo em consideração parâmetros como o tempo de gestação e a produção leiteira, podem alongar ou encurtar esta fase (Pinedo et al., 2011).

O facto de muitas vacas apresentarem uma considerável quantidade de leite produzido na altura prevista para a secagem, representa um desafio para o produtor (Santschi & Lefebvre, 2014). Segundo Rajala-Schultz et al (2005), uma produção cinco litros acima dos 12.5 litros no momento da secagem aumenta o risco de IIM no pós-parto em aproximadamente 77%.

Como forma de interromper a lactação, o produtor pode optar por uma interrupção abrupta ou intermitente gradual. A interrupção abrupta como o nome indica, trata-se da suspensão da ordenha de modo súbito no dia de secagem, não havendo nenhuma diminuição na frequência de ordenhas. Segundo Bertulat et al (2015) vacas que sejam secas a produzir grandes quantidades de leite de uma forma abrupta, apresentam elevados níveis de stress e uma maior probabilidade de ocorrer uma infeção intramamária ambiental após o parto.

Para a secagem intermitente gradual existem algumas opções, a primeira em que duas semanas antes do dia previsto para a secagem, a vaca é ordenhada apenas uma vez em dias alternados e outra em que a vaca pode ser ordenhada uma vez por dia na última semana de lactação, sendo que no dia antes da secagem, a vaca não é ordenhada (Dingwell et al., 2003).

Durante o período seco, a glândula mamária passa por três fases distintas. Numa primeira fase ocorre a involução do parênquima, que começa um ou dois dias depois da secagem e continua por 10 a 14 dias. Durante este tempo, a glândula fica particularmente vulnerável a uma nova infeção intramamária (Ruegg et al., 2015). Segue-se o período estacionário, em que segundo Biggs (2009), a ocorrência de novas IIM é geralmente baixa e caso haja, muitas vezes são eliminadas espontaneamente.

Por fim, temos a fase da lactogénese e colostogénese, que está inserida no período do periparto. Aqui, tal como na primeira fase, vai haver uma maior suscetibilidade a novas infeções por agentes ambientais, como *Streptococcus* spp. e coliformes (Cortes, 2016).

2.11.1. Maneio alimentar na prevenção de infeções

Numa exploração de bovinos leiteiros, como as vacas secas não se encontram em produção, existe a tendência para que o seu maneio seja mais descuidado.

As vacas que têm um período seco de aproximadamente 60 dias, apresentam dois planos alimentares, o primeiro em que a dieta é caracterizada por uma grande percentagem de forragem e baixa energia e depois, no período de transição em que lhes é fornecida uma alimentação com moderada energia (Cortes, 2016). Neste período, que compreende as últimas três semanas de gestação até às três semanas pós-parto, a vaca passa por alterações

metabólicas e endócrinas, nas quais as suas necessidades alimentares devem ser ajustadas de modo a ter um período de lactação bem-sucedido (Retamal, 2011). No momento do parto, coincidindo com o início da lactação, o animal entra em balanço energético negativo, cuja gravidade e duração pode ter um maior impacto no sistema imunitário (Beecher et al., 2011).

A imunossupressão presente no momento do parto é em parte causada pelo aumento dos níveis de concentração de cortisol em circulação, que prejudica a marginação e recrutamento dos neutrófilos (Ruegg et al., 2015).

Existem nutrientes que podem afetar a imunidade em vários aspetos na vaca, antes e no período do parto. De entre os minerais e vitaminas que podem influenciar o úbere destaca-se a vitamina E, o selénio, cobre, zinco, vitamina A e carotenos (Beecher et al., 2011).

A vitamina E é um componente de todas as membranas lipídicas e protege-as contra os ataques de espécies reativas de oxigénio. O selénio desempenha também esta função, como constituinte da enzima glutatíon peroxidase. A associação de vitamina E e selénio na alimentação das vacas secas diminui a incidência, a duração e a severidade das mastites presentes no efetivo (Beecher et al., 2011). Segundo as recomendações do National Research Council (NRC), uma vaca no período seco, deve ingerir 1000 UI/dia de vitamina E e 500 UI/dia durante a lactação. Contudo, segundo o estudo de Weiss et al (1997), vacas alimentadas com 4000 UI/dia de suplemento de vitamina E durante as últimas 2 semanas antes do parto e 2000 UI/dia durante o primeiro mês de lactação apresentam uma redução significativa de novas infeções da glândula mamária e de mastites clínicas comparado com os 1000 e 500 UI/dia, no período de seca e lactação, respetivamente.

O cobre é um componente da ceruloplasmina plasmática, que facilita a absorção e transporte do ferro e também é uma parte importante da enzima superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos dos metabolitos de oxigénio produzido pela fagocitose (Beecher et al., 2011). De acordo com Tiwari et al (2013), alguns estudos mostraram que alimento suplementado com cobre em novilhas reduz a severidade das mastites subclínicas bem como as clínicas provocadas pela *E.coli*.

O zinco é necessário na formação de queratina, ajudando na saúde e integridade da pele do teto (Beecher et al., 2011). A suplementação com este nutriente está associada a uma redução na contagem de células somáticas em algumas vacadas, segundo O'Rourke (2009) citando um estudo de Kincaid et al (1984). Também num estudo de Popovic em 2004, referido por O'Rourke (2009), ao substituir o suplemento inorgânico de sulfato de zinco por um orgânico, o proteinato de zinco, nos 45 dias pré-parto e durante 100 dias pós-parto, se verificou que essas vacas tiveram uma significativa descida de CCS (62670 vs 1164400 células/ml) ao dia 100 de lactação.

Os betacarotenos e a vitamina A também têm um papel importante na prevenção de ocorrência de mastites, muito provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes que estimulam o sistema imunitário e na contribuição da integridade da superfície da mucosa da glândula mamária, respetivamente (Tiwari et al., 2013).

2.10.2. Tratamento de mastites durante o período seco

Nas vacas leiteiras, o período seco é importante porque as infecções intramamárias adquiridas na lactação anterior bem como as que se poderão formar vão contribuir para a ocorrência de mastites subclínicas e clínicas durante a próxima lactação, com efeitos negativos na produção leiteira (Gundelach et al., 2011).

A antibioterapia no período seco foi desenvolvida nos anos 50, sendo inicialmente usada no controlo das mastites de verão e mais tarde adotada no plano de controlo dos cinco pontos, nos anos 60, em que todos os quartos de todas as vacas deviam ser tratados (Bradley & Green, 2004).

As vantagens que este tipo de tratamento apresenta são muitas, tais como: o aumento da taxa de sucesso terapêutico comparativamente à obtida quando é feito durante a lactação, a utilização de doses mais elevadas de antibióticos, a redução da incidência de novas infecções, menores perdas com o leite descartado, e o facto de permitir o tratamento de infecções não reconhecíveis, sendo que caso o tratamento seja bem-sucedido, o tecido mamário tem tempo para recuperar antes da próxima lactação (Owens & Nickerson, 2011).

Tal como os fármacos utilizados nas vacas lactantes, muitos antibióticos de secagem foram introduzidos quando *S. aureus* e *S. agalactiae* eram os principais agentes responsáveis pelas IIM no período seco na maioria das explorações, sendo a ação antimicrobiana mais dirigida para estas bactérias. Contudo, muitas infecções subclínicas, bem como novas infecções adquiridas durante este período são também provavelmente causadas por uma vasta gama de agentes ambientais, incluído estreptococos ambientais e coliformes. (Royster & Wagner, 2015).

O facto de se tratar todas as vacas, leva a que a questão das resistências antimicrobianas seja levantada, o que faz com tenhamos a responsabilidade de recomendar aos produtores que optem por uma terapêutica seletiva, isto é, só as vacas com quartos infetados vão ser tratadas, havendo assim uma diminuição do uso de antimicrobianos. Apesar de eliminar infecções existentes, nos animais tratados, este tipo de tratamento não previne a ocorrência de novas infecções em animais que não foram tratados. Para que este método fosse mais eficiente, no momento da “triagem”, para além dos registos da CCS individuais, o produtor deveria ter resultados bacteriológicos para um diagnóstico definitivo. No entanto, a cultura, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) implica o aumento do custos e o tempo de execução limita muitas vezes a sua utilização de rotina (Crispie et al., 2004).

Quando a vaca é seca é formado naturalmente um rolhão de queratina, tornando-se no maior mecanismo de defesa contra as infecções. Contudo, está reportado por Williamson et al (1995) citado por Crispie et al (2004), que a taxa de encerramento do canal do teto varia

bastante de vaca para vaca, tendo sido verificado que 50% dos animais continuavam com o canal aberto 10 dias após o início do período seco.

É a partir desta observação, que foi desenvolvido o conceito selante. Os selantes podem ser internos ou externos. Como os selantes externos são inefetivos numa terapia mais duradoura (Dingwell et al., 2003) vai se dar mais destaque aos internos.

Os selantes internos começaram a ser desenvolvidos no princípio dos anos 70, e consiste num sal inorgânico pesado, o subnitrato de bismuto. Acresce o facto de não possuírem nenhum antimicrobiano na sua constituição (Bradley & Green, 2004).

Este produto forma uma barreira inerte na porção mais distal da cisterna e no canal do teto, constituído assim uma barreira física, podendo ser utilizado de forma isolada ou em associação com um antibiótico, em que é administrado imediatamente a seguir a este.

A sua administração nos tetos deve ser feita com uma técnica assética (figura 6), pois pode ser uma porta de entrada para agentes patogénicos durante a infusão.

Os efeitos positivos dos selantes internos na redução de novas infeções intramamárias estão bem documentado por vários estudos, como o de Huxley et al (2002) , que demonstra que o selante interno apresenta uma redução significativa no número de novas IMM comparado com a aplicação única de um antibiótico (cefalónio).

Apesar destas evidências, é aconselhado o uso isolado do selante interno apenas em vacas com um baixo registo de células somáticas e sem mastites subclínicas (Rabiee & Lean, 2013). Também segundo Bradley et al (2011), o uso combinado de antibiótico e selante deve ser só aplicado em casos em que haja um grande aumento na CCS.

Para além dos protocolos já mencionados, e face ao critério de cada produtor, podem existir outras opções de tratamento. Bertulat et al (2015), num inquérito realizado constataram que 9,7% dos produtores não realizavam qualquer tipo de tratamento e que dois produtores usavam medicamentos homeopáticos durante este período.

Atualmente, a administração de antimicrobianos de longa ação por via intramamária, combinada ou não com selantes internos é o método mais efetivo para prevenir novas infeções e curar as existentes (Gundelach et al., 2011).

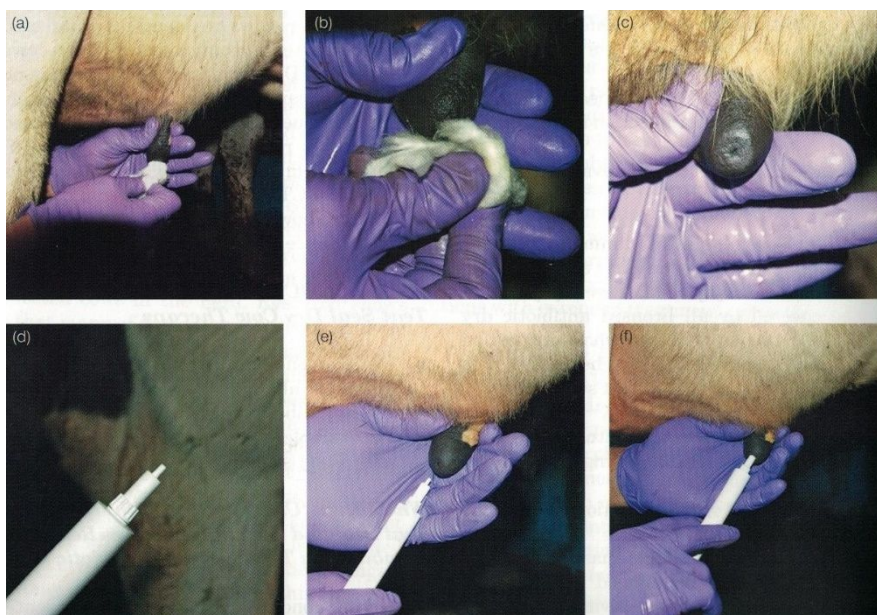


Figura 6-Administração de um aplicador com selante interno
(Adaptado de Biggs, 2009)

- a) e b) Desinfecção da extremidade do teto com algodão com álcool;
- c) Extremidade do teto completamente limpa;
- d) Seringa intramamária com uma ponta curta;
- e) Técnica de inserção parcial
- f) Infusão do produto

Em Portugal, de acordo com a lista de medicamentos autorizados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), existem 16 antibióticos utilizados no período seco pela via intramamária (tabela 7), cujos princípios ativos diferem e têm ação contra diferentes agentes etiológicos.

Tabela 7- Lista de Antimicrobianos autorizados em Portugal para o tratamento intramamário em vacas no período seco

Princípio Ativo	Nome Comercial	Ação contra
Ampicilina + cloxacilina	Bovimast Cloxapen DC Kloxerate Plus DC Syvamast Secagem	<i>Streptococcus agalactiae</i> e outras espécies de estreptococos, estafilococos penicilina-sensíveis e penicilina-resistentes, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e outras bactérias sensíveis gram-negativas
Cefalónio	Cepravin DC 250 mg	<i>Staphylococcus aureus</i> (incluindo estirpes penicilinoresistentes), <i>Streptococcus agalactiae</i> ,

		<i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Trueperella pyogenes</i> e <i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> spp. e <i>Enterobacter</i> spp.
Cefazolina	Cefovet DC 250 mg	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Escherichia coli</i>
Cefquinoma	Cefimam DC 150 mg Cefquinor DC 150 mg Virbactan	<i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus coagulase</i> negativo
Cloxacilina	Cloxacum 500 mg Mastivet Secado 50mg/ml Orbenin Extra	<i>Staphylococcus aureus</i> (incluindo estirpes penicilino- resistentes), <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> <i>uberis</i> , <i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i> , <i>Trueperella</i> <i>piogenes</i> , <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> , <i>Corynebacterium</i> spp. , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Neisseria</i> spp.
Neomicina, Penetamato e Benzilpenicilina	Multishield DC	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , outros <i>Streptococcus</i> spp., <i>Trueperella</i> <i>pyogenes</i> , <i>E.coli</i> .
Penetamato iohidrato, Penicilina benetamica e Sulfato de framicetina	Mamyzin. Secado	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus coagulase</i> negativo, <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>
Penicilina G Procaina, Di- hidroestreptomicina	Nafpenzal DC	SCN, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Escherichia Coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Trueperella pyogenes</i> , <i>Bacillus</i> <i>cereus</i>
Rifaximicina	Fatroximin 20mg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> (incluindo estirpes resistentes à penicilina), <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> <i>uberis</i> , <i>Trueperella pyogenes</i> .

II. Trabalho experimental

1. Materiais e métodos

1.1. Amostra

Para a amostra do presente estudo, foram selecionadas as vacas secas durante quatro meses, ficando elegíveis um total de 54 animais, tendo sido excluídas no decorrer do processo 10 animais, ficando uma amostra total de 44 animais ($n=44$). Os animais foram divididos em três protocolos de secagem diferentes com base nos registos anteriores da CCS. Sendo assim, a distribuição de animais ficou da seguinte forma: para o protocolo 1 ($n=21$), protocolo 2 ($n=15$) e protocolo 3 ($n=8$).

1.2. Desenho experimental

As vacas selecionadas para este estudo, consoante o seu historial de contagem de células somáticas, foram sujeitas a um dos três protocolos de tratamento de secagem estabelecido pela exploração (tabela 8)

Protocolo 1: Selante interno: aplicado a vacas com menos de $200(\times 10^3 \text{cél/ml})$ nos últimos dois contrastes leiteiros;

Protocolo 2: Cefalónio+ selante interno: aplicado a vacas com $200-400(\times 10^3 \text{cél/ml})$ nos últimos dois contrastes leiteiros;

Protocolo 3: Cefquinoma+selante interno: aplicado a vacas com mais de $400(\times 10^3 \text{cél/ml})$ nos últimos dois contrastes leiteiros;

Tabela 8- Distribuição dos animais pelos diferentes protocolos e pelo respetivo número de lactações

Protocolo		Número de lactações					Total
		2	3	4	5	6	
Protocolo 1	Frequência (n)	10	5	4	1	1	21
	FR (%)	47,6%	23,8%	19,0%	4,8%	4,8%	100,0%
Protocolo 2	Frequência (n)	6	5	3	1	0	15
	FR (%)	40,0%	33,3%	20,0%	6,7%	0,0%	100,0%
Protocolo 3	Frequência(n)	1	1	1	3	2	8
	FR(%)	12,5%	12,5%	12,5%	37,5%	25,0%	100,0%
Total	Frequência(n)	17	11	8	5	3	44
	FR(%)	38,6%	25,0%	18,2%	11,4%	6,8%	100,0%

1.3. Recolha de amostras

As amostras de leite para CCS foram realizadas em dois tempos distintos:

CCS1- amostra retirada na última ordenha antes do período de seca do animal;

CCS2- amostra retirada cinco a sete dias após o parto do animal, na ordenha da manhã ou da tarde, consoante a disponibilidade do operador.

Para estes procedimentos foram utilizados frascos específicos que continham um número para ser identificado no laboratório, sendo feita a correspondência com o animal (figura 7). A amostra era representativa de todos os quartos do animal, através de um tubo coletor montado ao sistema de ordenha (figura 8).



Figura 7-Frasco com a amostra de leite identificada

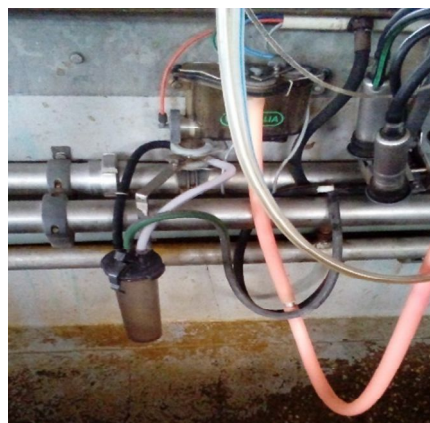


Figura 8-Sistema de coleção de leite para a amostra

Após a recolha da amostra CCS1 e de realizada a ordenha foi administrado a respetiva terapia de secagem (figura 9).

O mesmo processo foi realizado cinco a sete dias pós-parto, ou na ordenha da manhã ou da tarde, consoante a disponibilidade do operador, sendo determinada esta fase, como CCS2. Foi também registada a duração do período seco.

As amostras de CCS1 e CCS2 depois de colhidas foram armazenadas no frigorífico da exploração, sendo depois enviadas para o laboratório da ALIP (Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios), em que a mensuração dos resultados foi feita através do equipamento Fossomatic FC.

1.4. Análise estatística

O dia da colheita, número do frasco e a correspondência com o animal, protocolo de secagem e número de lactações foram registados e organizados em ficheiro Excel, bem como no programa DairyPlan® utilizado na exploração. O programa DairyPlan® foi previamente programado para alocar os animais pelos diferentes protocolos de secagem em função dos parâmetros previamente definidos.

Para valores da CCS superiores a 200.000 células/ml é considerado uma situação de mastite subclínica, nunca podendo confirmar a existência de infeção intramamária.

Os resultados serão apresentados em frequência absoluta (FA), frequência relativa (FR) e frequência cumulativa (FC), sendo estas duas expressas em %.

As diferenças nos resultados foram consideradas significativamente estatísticas para um valor de $p < 0,05$.

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa IBM SPSS® Versão 22 (2013), em que foram realizados os seguintes testes estatísticos:

- Medida kappa concordância;
- Teste K concordância de Cohen;
- Teste do Qui-quadrado (variante de Monte Carlo);
- Correlação de *Spearman*;



Figura 9-Administração de um protocolo de secagem

2.Resultados

2.1. Resultados de CCS1 e CCS2

Analisando os resultados de CCS 1 da amostra total (n=44), verificou-se que 50% dos animais apresentam menos de 200 ($\times 10^3$ cél/ml), 22,7% entre 200 e 400 ($\times 10^3$ cél/ml) e 27,3% mais de 400($\times 10^3$ cél/ml) (tabela 9).

Tabela 9- Contagem de células somáticas no momento da seca (CCS1) (n=44)

	FA	FR (%)	FC (%)
< 200 ($\times 10^3$ cél/ml)	22	50,0	50,0
200-400 ($\times 10^3$ cél/ml)	10	22,7	72,7
> 400 ($\times 10^3$ cél/ml)	12	27,3	100,0
Total	44	100,0	

Nos valores da CCS2, na amostra total (n=44) observou-se que 68,2% dos animais apresentam menos de 200($\times 10^3$ cél/ml), 20,5% entre 200 e 400 ($\times 10^3$ cél/ml) e 11,4% mais de 400($\times 10^3$ cél/ml). Estes valores podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10- Contagem de células somáticas cinco a sete dias após o parto (CCS2)
(n=44)

	FA	FR (%)	FC (%)
< 200 ($\times 10^3$ cél/ml)	30	68,2	68,2
200-400 ($\times 10^3$ cél/ml)	9	20,5	88,6
> 400 ($\times 10^3$ cél/ml)	5	11,4	100,0
Total	44	100,0	

2.2. Concordância entre o critério utilizado para a escolha do protocolo e a CCS1

Em relação à concordância entre o critério de escolha do protocolo de secagem utilizado com os resultados da CCS1, observa-se que em 54,5% dos casos existe concordância entre o critério utilizado e a CCS1. Ou seja, se o critério de escolha fosse a CCS1 o protocolo escolhido para cada vaca seria o mesmo em 54,5% dos casos (tabela 11). Dos casos em que não houve concordância, isto é, os valores obtidos em CCS1 não estão de acordo com os utilizados para a seleção do protocolo, observa-se que 18,2% (oito vacas) que foram tratadas com antibioterapia (protocolo 2 e 3) necessitariam, utilizando a CCS1 ($200(\times 10^3 \text{cél/ml})$), de apenas aplicar o selante interno (protocolo 1).

A 15,9% (sete vacas) foi só utilizado o protocolo 1 (selante interno), sendo que 11,4% vacas (cinco vacas) necessitariam do protocolo 2 (cefalônio+selante interno) e 4,5% (duas vacas) necessitariam do protocolo 3 (cefquinoma+selante interno). Na escolha do antibiótico não se verificou concordância em 11,4% (cinco vacas) que deveriam ter sido tratadas com um antibiótico diferente, isto é, 2,3% (uma vaca) foi tratada com o protocolo 3 (cefquinoma+selante), quando, a ser utilizado o critério CCS1, seria tratada com o protocolo 2 (cefalônio+selante) e 9,1% (4 vacas) seriam tratadas com o protocolo 3 (cefquinoma+selante) e foram medicadas com o protocolo 2 (cefalônio+selante). Estes resultados estão traduzidos na tabela 12, em que utilizando a medida Kappa concordância verifica-se que o nível de concordância entre o protocolo escolhido e o que seria seguido utilizando o critério de CCS1 é razoável ($K=0,283$) e estatisticamente significativo ($p=0,008$).

Tabela 11- Concordância entre o critério utilizado para a escolha do protocolo e o resultado da CCS1 (n=44)

Concordância	FA	FR (%)
Não	20	45,5
Sim	24	54,5
Total	44	100,0

Tabela 12- Distribuição dos valores da CCS1 em função do protocolo utilizado (n=44)

		Protocolo utilizado de acordo com os critérios				
			Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Total
Protocolo recomendado de acordo com resultado da CCS1	Protocolo 1	Frequência(n)	14	7	1	22
		FR (%)	31,8%	15,9%	2,3%	50,0%
	Protocolo 2	Frequência(n)	5	4	1	10
		FR (%)	11,4%	9,1%	2,3%	22,7%
	Protocolo 3	Frequência(n)	2	4	6	12
		FR (%)	4,5%	9,1%	13,6%	27,3%
	Total	Frequência(n)	21	15	8	44
		FR (%)	47,7%	34,1%	18,2%	100,0%

K=0,283; p=0,008

2.3. Evolução dos resultados de CCS1 e CCS2

Analisando os resultados obtidos de CCS1 e CCS2 (tabela 13), da amostra total (n=44), 17 animais mantiveram-se sem mastite subclínica (MSC), correspondendo a 38,6%. 13 animais (29.5%) que no início do período de seca apresentavam uma CCS superior a 200.000 células/ml passaram a ter valores inferiores a 200.000 células/ml.

Oito animais (18,2%) continuaram com mastite subclínica, enquanto que seis (13,6%) passaram a ter mastite subclínica. O teste estatístico realizado foi o teste K concordância de Cohen.

Tabela 13- Evolução entre os resultados da CCS1 e CCS2 (n=44)

	FA	FR(%)
Manutenção de sem mastite subclínica ($<200 \times 10^3$ cél/ml)	17	38,6
Melhoria para sem mastite subclínica ($<200 \times 10^3$ cél/ml)	13	29,5
Manutenção de mastite subclínica ($>200 \times 10^3$ cél/ml)	8	18,2
Evolução para mastite subclínica ($>200 \times 10^3$ cél/ml)	6	13,6
Total	44	100,0

Para cada protocolo, foi também analisada a evolução entre os resultados de CCS1 e CCS2, estando estes traduzidos na tabela 14.

Para o protocolo 1 (selante interno), dos 21 animais que foram sujeitos a este tratamento, 11 (52,4%) mantiveram-se sem mastite subclínica (isto é, $CCS2 < 200 \times 10^3$ cél/ml), enquanto que quatro vacas (19,0%) que apresentavam MSC, com base no resultado da CCS1, desceram para valores abaixo das 200.000 células/ml. Três animais (14,3%) que continuaram com a CCS2 superior às 200.000 e três (14,3%) que evoluíram para uma doença subclínica.

No protocolo 2 (cefalónio+selante interno), cinco animais (33,3%) mantiveram-se sem mastite e seis animais (40,0%) com MSC no momento da secagem desceram para valores inferiores a 200.000 células/ml. Dos quatro casos que apresentaram uma CCS2 superior a 200.000 células/ml, um (6,7%) já tinha MSC no momento da seca, e três (20,0%) revelaram mastite subclínica apenas na CCS2.

O protocolo 3 (cefquinoma+selante interno) apresentou um caso (12,5%) em que o valor de CCS2 manteve-se abaixo das 200.000 cél/ml como em CCS1, enquanto que três animais (37,5%) passaram de uma mastite subclínica em CCS1 para sem MSC na CCS2. Apesar de não ter existido nenhuma situação em que existisse um surgimento de um novo caso subclínico, quatro vacas (50,0%) mantiveram valores acima das 200.000 cél/ml. De acordo com o teste do Qui-quadrado (variante de Monte Carlo) $\chi^2(8)=12,835$; $p=0,109$ não se observa uma relação significativa entre o protocolo utilizado e a evolução ($p>0,05$)

Tabela 14- Evolução entre os resultados de CCS1 e CCS2 para cada protocolo utilizado (n=44)

Protocolo utilizado		Evolução de resultado: CCS1/CCS2				Total
		Manutenção de sem MSC(<200(x10 ³ cél/ml))	Melhoria para sem MSC (<200(x10 ³ cél/ml))	Manutenção de MSC(>200(x10 ³ cél/ml))	Evolução para MSC (>200 (x10 ³ cél/ml))	
Protocolo 1	FA(n)	11	4	3	3	21
	FR(%)	52,4%	19,0%	14,3%	14,3%	100,0%
Protocolo 2	FA(n)	5	6	1	3	15
	FR(%)	33,3%	40,0%	6,7%	20,0%	100,0%
Protocolo 3	FAn)	1	3	4	0	8
	FR(%)	12,5%	37,5%	50,0%	0,0%	100,0%
Total	FA(n)	17	13	8	6	44
	FR(%)	38,6%	29,5%	18,2%	13,6%	100,0%

Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(8)=12,835$; $p=0,109$

2.4. Evolução dos resultados da contagem de células somáticas em função da existência ou não de concordância entre o critério utilizado e a CCS1

Neste ponto avaliou-se se a existência ou não de concordância entre o critério utilizado para seleção do protocolo de secagem e a CCS1 influenciou a evolução dos animais aquando da avaliação em pós-parto (CCS2).

Como se pode observar na tabela 15, nas situações em que a escolha do protocolo 1 (selante interno) seria a escolha recomendada se o critério fosse CCS1, 78,1% dos animais melhoraram para uma situação sem doença e 21,4% evoluíram uma CCS superior a 200.000 células/ml, ou seja, evoluíram para uma situação de mastite subclínica. Já nos casos em que não houve concordância entre o critério escolhido e a CCS1, 57,1% das vacas melhoraram para uma situação de sem mastite e 42,9% dos animais continuaram com valores superiores a 200.000 células/ml.

No que concerne o protocolo 2 (cefalónio+selante interno) quando os critérios foram concordantes, 75% dos animais melhoraram para um estado de não mastite subclínica enquanto 25% evoluíram esse quadro clínico. Nos casos em que o protocolo 2 foi utilizado, mas não teria sido de acordo com a CCS1, 45,5% dos animais mantiveram-se sem evidência de MSC.

Nos casos em que houve concordância entre o critério utilizado e a CCS1 para o protocolo 3 (cefquinoma+selante interno), 50% dos animais melhoraram mas 50% mantiveram-se com doença subclínica. Quando não houve concordância, 50% dos animais mantiveram-se sem MSC e 50% mantiveram uma CCS superior a 200.000 células/ml.

Tabela 15- Evolução dos resultados de CCS1 e CCS2 em função da existência ou não de concordância entre o critério utilizado e a CCS1 (n=44)

Protocolo		Evolução de resultado: CCS1/CCS2					Total
			Manutenção de sem MSC(<200(x10 ³ cél/ml))	Melhoria para sem MSC(<200(x10 ³ cél/ml))	Manutenção de MSC(>200(x10 ³ cél/ml))	Evolução para MSC(>200(x10 ³ cél/ml))	
Protocolo 1	Concordância	FA (n)	11	0	0	3	14
		FR (%)	78,6%	0,0%	0,0%	21,4%	100,0%
	Não concordância	FA (n)	0	4	3	0	7
		FR(%)	0,0%	57,1%	42,9%	0,0%	100,0%
Protocolo 2	Concordância	FA (n)	0	3	0	1	4
		FR(%)	0%	75%	0	25%	100,0%
	Não concordância	FA (n)	5	3	1	2	11
		FR(%)	45,5%	27,3%	9,1%	18,2%	100,0%
Protocolo 3	Concordância	FA (n)	0	3	3	0	6
		FR (%)	0%	50%	50%	0%	100,0%
	Não concordância	FA(n)	1	0	1	0	2
		FR (%)	50%	0%	50%	0%	100,0%

Analisando os dados separadamente entre concordância e não concordância entre critérios foi feita a análise estatística.

Pode se inferir que nas situações em que há concordância entre critérios (tabela 16), as diferenças são estatisticamente significativas($p < 0,05$), observando-se uma relação entre o protocolo utilizado e a evolução dos resultados em CCS1/CCS2, no caso em que o protocolo utilizado é concordante com o resultado em CCS1 (Qui-quadrado; $\chi^2(6)=27,214$; $p=0,000$). Os animais de protocolo 1 (selante interno) tendem a manterem-se sem mastite subclínica (ResAjust=3,8), os com protocolo 2 (cefalônio+selante) tendem a passar para sem MSC (ResAjust=2,5) e os com protocolo 3 (cefquinoma+selante) a verem a doença persistir (ResAjust=3,2).

Nos casos em que não há concordância entre critérios (tabela 17), através do teste do Qui-quadrado (variante de Monte Carlo) $\chi^2(6)=9,254$; $p=0,141$, verificou-se não existirem diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), não se observando uma relação entre o protocolo utilizado e a evolução dos resultados de CCS1 e CCS2.

Tabela 16- Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em protocolos recomendados de acordo com os critérios estabelecidos (n=24)

Protocolo utilizado		Evolução de resultado: CCS1/CCS2				Total
		Manutenção de sem MSC (<200(x10 ³ cél/ml))	Melhoria para sem MSC (<200(x10 ³ cél/ml))	Manutenção o MSC(>200(x10 ³ cél/ml))	Evolução de para MSC(>200(x10 ³ cél/ml))	
Protocolo 1	FA(n)	11	0	0	3	14
	FR(%)	78,6%	0,0%	0,0%	21,4%	100,0%
Protocolo 2	FA(n)	0	3	0	1	4
	FR(%)	0,0%	75,0%	0,0%	25,0%	100,0%
Protocolo 3	FA(n)	0	3	3	0	6
	FR(%)	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	100,0%
Total	FA(n)	11	6	3	4	24
	FR(%)	45,8%	25,0%	12,5%	16,7%	100,0%

Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(6)=27,214$; $p=0,000$

ResAjust=3,8 - Noroseal * Manutenção de sem mastite subclínica (<200 cel/ml*1000)

ResAjust=2,5 - Cepravin + Noroseal * Melhoria para sem mastite subclínica (<200 cel/ml*1000)

ResAjust=3,2 - Virbactan + Noroseal * Manutenção de mastite subclínica (>200 cel/ml*1000)

Tabela 17- Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em protocolos que não seguiram os critérios previamente estabelecidos(n=20)

Protocolo utilizado		Evolução de resultado: CCS1/CCS2				Total
		Manutenção de sem MSC (<200(x10 ³ células/ml))	Melhoria para sem MSC(<200(x10 ³ células/ml))	Manutenção de MSC (>200(x10 ³ células/ml))	Evolução para MSC (>200(x10 ³ células/ml))	
Protocolo 1	FA(n)	0	4	3	0	7
	FR(%)	0,0%	57,1%	42,9%	0,0%	100,0%
Protocolo 2	FA(n)	5	3	1	2	11
	FR(%)	45,5%	27,3%	9,1%	18,2%	100,0%
Protocolo 3	FA (n)	1	0	1	0	2
	FR(%)	50,0%	0,0%	50,0%	0,0%	100,0%
Total	FA (n)	6	7	5	2	20
	FR(%)	30,0%	35,0%	25,0%	10,0%	100,0%

Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(6)=9,254$; $p=0,141$

2.5. Comparação entre os três protocolos utilizados

Apresenta-se a título descritivo, a evolução da CCS1 e CCS2 em função do protocolo escolhido e do estadió inicial (tabela 18). Para o protocolo 1 (selante interno) verificou-se que dos 14 animais que apresentavam uma CCS inferior a 200.000 células/ml, 11 mantiveram-se com esse valor. Dos cinco animais que tinham valores entre as 200.000 e 400.000 células/ml, em dois deles ocorreu redução da CCS e debelaram a MSC, enquanto que os outros três continuaram com situação inicial.

Em relação ao protocolo 2 (cefalónio+selante interno), dos sete animais que apresentaram uma CCS inferior a 200.000 células/ml, cinco continuaram dentro desse limite, existindo dois em que se verificou um aumento da CCS, passando para uma situação de mastite subclínica. Das quatro vacas que apresentaram um estadió inicial concordante com a aplicação do protocolo, três baixaram para valores inferiores a 200.000 células/ml, enquanto que apenas uma evoluiu para MSC. Dos quatro animais sujeitos ao protocolo 2 que apresentavam uma CCS superior a 400.000 células/ml, três passaram para uma CCS inferior a 200.000 células/ml e um continuou com valores acima dessa referência numérica.

No protocolo 3 (cefquinoma+selante interno), dos dois animais que não tiveram concordância entre o critério utilizado e a CCS1, o que apresentava uma CCS inferior a 200.000 células/ml manteve-se nesse limite, enquanto que o tinha um valor compreendido entre 200.000 e 400.000 células/ml melhorou para uma situação de ausência de mastite subclínica. Por fim, dos seis animais com valores superiores a 400.000 células/ml, correspondendo a mastite subclínica, três melhoram para sem MSC e os outros três continuaram com valores correspondentes a uma situação de MSC.

Tabela 18-Evolução dos resultados de CCS1/CCS2 em função do protocolo escolhido e do estadió inicial

			Evolução de resultado: CCS1/CCS2			
			Manutenção sem MSC ($<200(x10^3 \text{cél/ml})$)	Melhoria para sem MSC ($<200(x10^3 \text{cél/ml})$)	Manutenção de MSC ($>200(x10^3 \text{cél/ml})$)	Evolução para MSC ($>200(x10^3 \text{cél/ml})$)
	CCS1	FA(n)				
Protocolo 1	$<200(x10^3 \text{cél/ml})$	14	11			3
	200-400($x10^3 \text{cél/ml}$)	5		2	3	
	$>400(x10^3 \text{cél/ml})$	2		2		
	Total FA(n)	21				
Protocolo 2	$<200(x10^3 \text{cél/ml})$	7	5			2
	200-400($x10^3 \text{cél/ml}$)	4		3		1
	$>400(x10^3 \text{cél/ml})$	4		3	1	
	Total FA (n)	15				
Protocolo 3	$<200(x10^3 \text{cél/ml})$	1	1			
	200-400($x10^3 \text{cél/ml}$)	1		1		
	$>400(x10^3 \text{cél/ml})$	6		3	3	
	Total FA(n)	8				

2.6. Influência do número de lactações na existência de mastite subclínica no pós-parto através da avaliação da CCS2

Na tabela 19 pode observar-se o efeito do número de lactações na CCS2, ou seja, no aparecimento de mastite subclínica no pós-parto. Verificou-se que a maioria dos animais sem doença (53,3%), corresponde a vacas com duas lactações. De entre as vacas com MSC moderada (200.000 e 400.000 células/ml) 33% tem três lactações e entre as vacas com

infecção severa (>400.000 células/ml) 60% dos animais têm quatro lactações. O número de lactações influenciou significativamente a CCS2 indicando uma relação entre a existência de mastite subclínica (Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(8)=16,317$; $p=0,040$). Os animais com duas lactações tendem a ter CCS2 inferior a 200.000 células/ml ($\text{resAjust}=2,9$), os animais com seis lactações a terem CCS2 entre 200-400 células/ml ($\text{ResAjust}=2,1$) e os com 3 lactações CCS2 maior que 400.000($\text{ResAjust}=1,9$).

Tabela 19- CCS2 em função do número de lactações($n=44$)

Resultado da CCS2		Número de lactações					Total
		2	3	4	5	6	
< 200 ($\times 10^3$ cél/ml)	FA	16	6	5	2	1	30
	FR(%)	53,3%	20,0%	16,7%	6,7%	3,3%	100,0%
200-400 ($\times 10^3$ cél/ml)	FA(n)	0	2	3	2	2	9
	FR(%)	0,0%	22,2%	33,3%	22,2%	22,2%	100,0%
> 400 ($\times 10^3$ cél/ml)	FA(n)	1	3	0	1	0	5
	FR(%)	20,0%	60,0%	0,0%	20,0%	0,0%	100,0%
Total	FA(n)	17	11	8	5	3	44
	FR(%)	38,6%	25,0%	18,2%	11,4%	6,8%	100,0%

Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(8)=16,317$; $p=0,040$

$\text{ResAjust}=2,9$ - CCS2 <200 * 2 lactações

$\text{ResAjust}=2,1$ - CCS2 200-400 * 6 lactações

$\text{ResAjust}=1,9$ - CCS2 >400 * 3 lactações

Estes resultados podem ser traduzidos através do gráfico 1, em que animais que apresentaram CCS2 inferiores a 200.000 células/ml, apresentam uma mediana de número de lactações mais baixa, seguindo-se os animais com valores superiores a 400.000 células/ml e por fim, aqueles cujos valores se situam entre as 200.000 e as 400.000 células/ml.

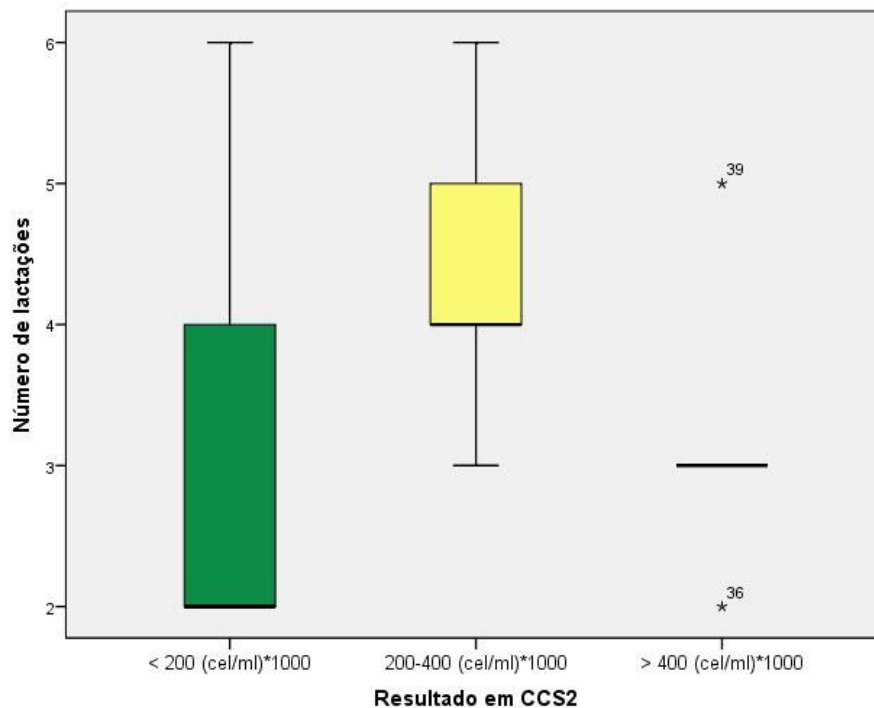


Gráfico 1- Distribuição do número de lactações em função da CCS2

No sentido de se testar se existia uma relação linear entre o número de lactações e os resultados de CCS2, calculou-se a correlação de *Spearman*. Verificou-se se uma correlação positiva significativa de baixa intensidade entre o numero de lactações e a CCS2 (*Spearman*; $r=0,338$; $p=0,009$). Quanto maior o numero de lactações, mais elevado o resultado da CCS2.

2.7. Influência da duração do período seco na existência de mastite subclínica no pós-parto através da avaliação da CCS2

Na tabela 20 pode observar-se a distribuição da duração do período seco na amostra estudada. Os animais foram agrupados em duas classes com um período seco menor ou igual a 60 dias ($n=25$, FR 56,8%) e com um período seco maior que 60 dias ($n= 19$, FR 43,2%). A duração média do período seco foi de 62,48 dias, tendo como o mínimo 50 dias e o máximo de 181 dias.

Tabela 20-Distribuição dos animais em função da duração do período seco (dias) (n=44)

Duração do período seco	N	%	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
<= 60 dias	25	56,8	50	60	55,96	3,506
> 60 dias	19	43,2	61	181	71,05	26,767
Total	44	100,0	50	181	62,48	19,078

Numa tentativa de perceber se a duração do período seco tinha influência nos resultados de CCS2 (tabela 21), verificou-se que dos 25 animais com 60 ou menos dias de período seco 64% apresentam uma CCS2 < 200.000 células/ml.

Dos 19 animais com mais de 60 dias de período seco 73,7% apresentam uma CCS2 < 200.000 células/ml.

A duração do período seco não influenciou assim significativamente a CCS2 (Qui-quadrado; $\chi^2(2)=2,336$; $p=0,320$).

Tabela 21-Influência da duração do período seco na CCS2 com base na duração do período seco

		Resultado da CCS2			Total
		< 200 (x10 ³ cél/ml)	200-400 (x10 ³ cél/ml)	> 400 (x10 ³ cél/ml)	
<= 60 dias	FA(n)	16	7	2	25
	FR(%)	64,0%	28,0%	8,0%	100,0%
> 60 dias	FA(n)	14	2	3	19
	FR(%)	73,7%	10,5%	15,8%	100,0%
Total	FA(n)	30	9	5	44
	FR(%)	68,2%	20,5%	11,4%	100,0%

Qui-quadrado (variante de Monte Carlo); $\chi^2(2)=2,336$; $p=0,320$

2.8. Incidência de mastite clínica na exploração

Nos 44 animais estudados verificou-se a ocorrência de três casos de mastite clínica no primeiro mês de lactação (6,8%).

Das três mastites clínicas detetadas, duas foram de animais tratados com o protocolo 2 (cefalónio+selante interno), enquanto que o outro caso foi administrado o protocolo 1 (selante interno).

3. Discussão

A mastite subclínica é uma realidade na maioria das explorações leiteiras, representando para o produtor uma fonte importante de perdas económicas (Rabiee & Lean, 2013). Têm sido estudados vários protocolos para maximizar a sua prevenção, sendo que, uma das práticas mais correntes é a aplicação de tratamentos de secagem. A escolha dos diferentes tratamentos pode ser feita de acordo com vários critérios e, muitas vezes, o produtor utiliza os dados que estão disponíveis, nomeadamente os dados que recebe do contraste leiteiro regular. É fundamental perceber se estes resultados permitem escolher o tratamento adequado ou não.

De extrema importância nesta avaliação é o estado de saúde de úbere em que as vacas se encontram aquando do momento da secagem. Neste estudo observou-se que, no momento da secagem (CCS1), e considerando que existe mastite subclínica para valores superiores a 200.000 células/ml (Sharma et al (2011), metade dos animais do estudo (22 vacas) apresentavam este tipo de mastite. Este resultado vem reforçar a importância da antibioterapia de secagem, já que de facto existia doença subclínica nesse momento.

No que concerne a concordância entre os critérios utilizados, com base na média dos dois últimos contrastes, e a CCS no momento da secagem (CCS1) verificou-se que apenas em 54,5% dos casos, a contagem era coincidente, realçando a importância de ter registos mais atuais da contagem de células somáticas, pelo menos quatro semanas antes do período de secagem (Crispie et al., 2004), levando-nos a especular sobre se será melhor utilizar a média dos dois últimos contrastes ou apenas o valor do último contraste.

O estabelecimento de critérios para utilizar ou não antibioterapia na secagem vem ao encontro da necessidade urgente de reduzir o uso de antibióticos. Ao analisar os dados deste estudo, existiram casos em que, pela CCS1, as vacas poderiam ter sido tratadas somente com selante interno (oito), pelo que se poderá questionar se o tratamento com antibioterapia terá ou não sido aplicado desnecessariamente. Segundo Crispie et al (2004), vacas com menos de 200.000 células/ml só devem ser tratadas com selante interno.

Comparando a evolução global da CCS entre os dois momentos avaliados, CCS1 e CCS2, podemos verificar que houve 17 casos em que os animais mantiveram uma CCS inferior a 200.000 células/ml, enquanto que 13 animais (38,6%) que tinham doença no momento da secagem (CCS1) debelaram a mastite, passando a ter CCS2 inferiores. Estes valores vêm ao encontro da bibliografia, em que num estudo de Rabiee and Lean (2013), o uso de selantes internos sozinho ou combinado com um antibiótico, reduz o risco de mastite em 25%.

Contudo, existem casos em que a doença se manteve e houve seis casos (13,6%) em que os animais passaram de um estado de não afetados para afetados. Estas situações podem ser explicadas por uma má higienização aquando da execução dos tratamentos ou

pelos antibióticos utilizados não terem um espectro de ação para os agentes etiológicos responsáveis por essas possíveis infeções. É assim cada vez mais importante a realização de cultura microbiológica, a identificação do agente e a realização de testes de sensibilidade aos antibióticos, de modo a poder-se escolher a terapia adequada. Porém, como anteriormente já referido, em termos práticos, muitas vezes o produtor não está sensibilizado para essa opção.

Sendo um dos objetivos deste estudo verificar a eficácia para cada protocolo, de entre os 21 animais que foram tratados somente com o selante (Noroseal®), 52,4% mantiveram-se abaixo das 200.000 células/ml e 19,0% passaram para uma situação de não infeção. Pode-se inferir que na maioria dos animais o selante foi eficaz na prevenção de novas infeções. A resolução da mastite subclínica sem antibioterapia realça o facto de muitas vezes os próprios mecanismos de defesa do animal serem suficientes para debelarem a infeção sem necessidade de recorrer à utilização de antibióticos.

De entre os 15 animais tratados com o protocolo 2 (cefalónio + selante interno), é importante realçar que seis animais (40,0%) deixaram de ter a afeção e 33,3% dos animais continuaram com CCS inferiores a 200.000 células/ml. Pode-se assumir que este protocolo foi também eficiente quer a tratar animais doentes quer a prevenir novas infeções em mais do que 70% dos casos.

No protocolo 3 (cefquinoma+selante interno) que foi utilizado em oito animais, não existiu nenhum animal que passasse de uma situação de não mastite para mastite, tendo 37,5% dos animais passando para valores inferiores a 200.000 células/ml.

Na medida em que os critérios de inclusão num ou noutro protocolo se baseiam na contagem de células somáticas iniciais, é difícil de comparar a eficácia ou sucesso entre os três protocolos. Os animais partem de um estadio de saúde do úbere diferente. Para podermos comparar os três protocolos teríamos de os aplicar a vacas no mesmo estadio inicial de CCS. Por exemplo, sabemos que após a aplicação do protocolo 1, das 21 vacas tratadas 15 não apresentaram MSC, mas de facto, a maioria destes animais já tinham, antes da CCS2, uma baixa contagem de células somáticas.

Verificou-se igualmente que a não concordância entre os critérios utilizados (dados do contraste ou CCS1) não influenciou significativamente a evolução clínica nos animais em função do protocolo aplicado. No entanto, quando os critérios foram concordantes verificou-se que existiram resultados mais favoráveis para cada protocolo no que respeita à evolução clínica dos animais. Estes dados reforçam mais uma vez, a importância dos registos dos contrastes leiteiros atualizados, ficando por definir quais os registos mais úteis de se ter em atenção. Numa situação ideal a CCS1 ao momento seria o critério mais eficaz para escolher conscientemente o protocolo correto.

Quando se relacionou o número de lactações com a existência de mastite subclínica no pós-parto (CCS2), verificou-se existir uma correlação positiva significativa de baixa intensidade (*Spearman*; $r=0,338$; $p=0,009$), entre o número de lactações e a contagem de

células somáticas, ou seja, quanto maior o número de lactações, maior a CCS. Isto traduz bem o que Gundelach et al. (2011) referem ao dizerem que vacas mais velhas têm um maior risco de novas infeções durante o período seco, bem como de desenvolverem mastites no pós parto. Como já referido, com o passar das lactações, existem alterações anatómicas nos tetos com efeitos negativos na resistência local, com o aumento do canal do teto bem como a diminuição da contractilidade do esfíncter (Gundelach et al., 2011). No que se refere a vacas com CCS2 superior a 400 000 células/ml, o baixo número de animais não permite tirar grandes conclusões.

Tentou-se também relacionar a duração do período com a ocorrência de mastite subclínica no pós-parto. Contudo, não houve relação entre estas duas variáveis. Esta conclusão está de acordo com os estudos de Schlamberger et al (2010), Watters et al (2008), em que verificaram não existir diferenças na CCS da lactação seguinte entre animais com diferentes durações de período seco.

Por fim, a incidência de mastites clínicas no primeiro mês foi apenas de 6,8%, traduzindo-se em três casos. Aqui tem de se realçar que dois dos casos foram de vacas sujeitas a antibioterapia, mais concretamente, com o protocolo 2 (cefalónio+selante interno). Logo, desses 23 animais, 91,31% não tiveram mastite clínica. No estudo de Golder et al (2016), através da análise de sobrevivência de uma curva de Kaplan-Meier verificaram que nos primeiros 30 dias, 96,3% das vacas sujeitas a antibiótico e selante interno não apresentaram infeção clínica, estando assim os resultados do estudo de acordo. Como nota crítica, fica o facto de não se ter verificado qual a incidência para os 60 dias como no estudo anteriormente referido, bem como não se ter realizado uma cultura bacteriológica para determinação dos agentes etiológicos responsáveis.

4. Conclusão

Sendo as mastites das doenças mais dispendiosas para uma exploração de bovinos leiteiros, todas as intervenções que fazem com haja uma redução do risco de infeção, independentemente dos microrganismos responsáveis são consideradas benéficas.

A terapia de secagem tem assim, um papel fundamental na rotina de uma vacaria. Muito há ainda a saber sobre os critérios de escolha, sobretudo com vista a reduzir a utilização dos antibióticos de modo consciente.

O registo das contagens de células somáticas individuais é um dos critérios mais utilizados para a escolha. É de realçar que estes registos devem ser o mais atuais possíveis, pois no estudo, dos 44 animais, em 20 (correspondendo a 45,5%) a contagem de células somáticas média dos últimos contrastes não era concordante com a CCS no momento da secagem (CCS1). Quanto mais próximo da secagem for efetuada a contagem de células somáticas mais representativa será do estado de saúde do úbere do momento da secagem.

Como perspectiva futura seria interessante correlacionar o valor individual de cada um dos contrastes utilizados para a média com a contagem de células somáticas no momento da secagem (CCS1).

A escolha do selante interno para casos de vacas sem infecção subclínica revelou-se eficaz, uma vez que dos animais (14) que foram alvo deste produto e cuja CCS era inferior às 200.000 células/ml, 78,6% se mantiveram dentro desse intervalo na CCS a seguir ao parto.

Os protocolos com antibioterapia e selante também se revelaram eficazes, tendo os animais do qual o protocolo 2 (cefalónio+selante interno) foi administrado em casos de concordância com os resultados de CCS1 mostrado uma tendência de passarem de uma situação de infecção para não infecção.

A taxa de incidência de mastites clínicas no primeiro mês de lactação foi baixa (6,8%), indo ao encontro de estudos anteriores, revelando assim a eficácia da terapia de secagem na prevenção de novas infeções pós-parto.

Contudo o risco de surgimento de novos microrganismos tem de ser sempre posto em consideração, o que leva a que seja fulcral a realização de cultura e identificação microbiológica bem como de testes de sensibilidade aos antibióticos.

Sendo este um ensaio clínico realizado numa exploração em contexto real existem sempre algumas limitações. Uma das restrições prende-se com a homogeneidade do número de animais entre grupos, já que os animais foram alocados nos diferentes grupos em função dos critérios previamente estabelecidos na exploração.

Como futuro, outros estudos devem ser realizados com uma amostra maior e cujos grupos selecionados tenham uma homogeneidade. Outra sugestão será a comparação de terapia isolada de antibiótico com o uso do mesmo combinado com selante interno, como já realizada em diversos estudos.

5. Bibliografia

- Aslantaş, Ö., and Demir, C. (2016). Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J. Dairy Sci.* 99, 8607–8613.
- Beecher, C., McCarthy, T.V., and Giblin, L. (2011). Mastitis and Bovine Milk Production. In *Dairy Cow: Nutrition, Fertility and Milk Production*, (New York: Nova Science Publishers), pp. 1–56.
- Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., and Heuwieser, W. (2015). A survey of drying-off practices on commercial dairy farms in northern Germany and a comparison to science-based recommendations. *Vet. Rec. Open* 2, e000068.
- Bexiga, R., Cavaco, L., and Vilela, C.L. (2002). Isolamento de *Prototheca zopfii* como agente etiológico de mastite subclínica em bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98, p.33-37
- Bexiga, R., Cavaco, L.M., and Vilela, C.L. (2005). Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 100, p. 39–44.
- Biggs, A. (2009). *Mastitis in Cattle*, (Wiltshire: The Crowood Press), Reino Unido, ISBN:978184797071, pp.208
- Blowey, R., and Edmondson, P. (2010a). Chapter 2: Structure of Teats and Udder and Mechanisms of Milk Synthesis. In *Mastitis Control in Dairy Herds*, (CAB International), EUA, ISBN:9781845935504 pp. 5–19.
- Blowey, R., and Edmondson, P. (2010b). Chapter 3: Teat and Udder Defences Against Mastitis. In *Mastitis Control in Dairy Herds*, (CAB International), EUA, ISBN:9781845935504, pp. 21–32.
- Blowey, R., and Edmondson, P. (2010c). Chapter 4: The Mastitis Organisms. In *Mastitis Control in Dairy Herds*, (CAB International), EUA, ISBN:9781845935504, pp. 34–59.
- Blowey, R., and Edmondson, P. (2010d). Chapter 12: Treatment and Dry Cow Therapy. In *Mastitis Control in Dairy Herds*, (CAB International), EUA, ISBN:9781845935504 p.194-214
- Bradley, A.J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Vet. J.* 164, 116–128.

Bradley, A.J., and Green, M.J. (2004). The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 547–568.

Bradley, A.J., Breen, J.E., Payne, B., Williams, P., and Green, M.J. (2010). The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *J. Dairy Sci.* 93, 1566–1577.

Bradley, A.J., Breen, J.E., Payne, B., and Green, M.J. (2011). A comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. *J. Dairy Sci.* 94, 692–704.

Burvenich, C., Merris, V.V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., and Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521–564.

Cardozo, L.L., Thaler Neto, A., Souza, G.N., Picinin, L.C.A., Felipus, N.C., Reche, N.L.M., Schmidt, F.A., Werncke, D., and Simon, E.E. (2015). Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *J. Dairy Sci.* 98, 7675–7685.

Collado, R., Prenafeta, A., González-González, L., Pérez-Pons, J.A., and Sitjà, M. (2016). Probing vaccine antigens against bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine* 34, 3

Constable, P.D., and Morin, D.E. (2003). Treatment of clinical mastitis: Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 139–155. 848–3854.

Cortes, C.A. (2016). Fatores de risco durante o período seco para a ocorrência de mastites após o parto. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp 106

Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., and Meaney, W.J. (2004). Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal - a review. *Ir. Vet. J.* 57, 412–418.

de Jong, A., Garch, F.E., Simjee, S., Moyaert, H., Rose, M., Youala, M., and Siegwart, E. (2017). Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet. Microbiol.* 213, 73–81.

DGAV (2017). Direção Geral de Alimentação e Veterinária. MedVet. Acedido a 05/07/2017; disponível em <http://www.medvet.simpodium.pt/PesquisarATC>

Dingwell, R.T., Kelton, D.F., and Leslie, K.E. (2003). Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 235–265.

Downling, P.M. (2013). Chapter 14 Aminoglycosides and Aminocyclitols. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.233-255

Erskine, R.J., Bartlett, P.C., VanLente, J.L., and Phipps, C.R. (2002). Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2571–2575.

European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2016. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014'. (EMA/61769/2016)

Fox, L.K. (2012). Mycoplasma Mastitis: Causes, Transmission, and Control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 225–237.

Giguère, S. (2013). Chapter 12 Lincosamides, Pleuromutilins and Streptogramins. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.519-528

Godden, S.M., Royster, E., Timmerman, J., Rapnicki, P., and Green, H. (2017). Evaluation of an automated milk leukocyte differential test and the California mastitis test for detecting intramammary infection in early- and late-lactation quarters and cows. *J. Dairy Sci.*

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., and Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245–259.

Guarín, J.F., and Ruegg, P.L. (2016). Short communication: Pre- and postmilking anatomical characteristics of teats and their associations with risk of clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99, 8323–8329.

Guerrero, F., García, J., and Casalta, J. (2016). *Inmunología y enfermedades infecciosas en vacuno* (Zaragoza: Servet).

Gundelach, Y., Kalscheuer, E., Hamann, H., and Hoedemaker, M. (2011). Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *J. Vet. Sci.* 12, 227–233.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., and Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.* 29, 18–31.

Hogeveen, H., Huijps, K., and Lam, T.J.G.M. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16–23.

Huxley, J.N., Green, M.J., Green, L.E., and Bradley, A.J. (2002). Evaluation of the Efficacy of an Internal Teat Sealer During the Dry Period. *J. Dairy Sci.* 85, 551–561.

IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Kincaid RL, Hodgson AS, Riley RE et al. (1984) Supplementation of diets for lactating with zinc oxide and zinc methionine. *J Dairy Sci Suppl.* 1,103.

Lam, T., Olde Riekerink, R., Sampimon, O., and Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Ir. Vet. J.* 62, S34.

Marques, A.C. de F. (2008). O medicamento veterinário em Portugal: do registo à comercialização. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp.111

Mein, G.A. (2012). The Role of the Milking Machine in Mastitis Control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 307–320.

Montironi, I.D., Cariddi, L.N., and Reinoso, E.B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 210–216.

Neiwert, O., Holst, O., and Duda, K.A. (2014). Structural investigation of rhamnose-rich polysaccharides from *Streptococcus dysgalactiae* bovine mastitis isolate. *Carbohydr. Res.* 389, 192–195.

Nunes, A. (2004). Capítulo 2: Algumas notas sobre a anatomia e fisiologia da glândula mamária no leite: Mecanismos de Produção, (Fenalac), p.30-49

O'Halloran, F., Beecher, C., Chaurin, V., Sweeney, T., and Giblin, L. (2016). Lactoferrin affects the adherence and invasion of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **99**, 4619–4628.

Oliver, S.P., Almeida, R.A., Gillespie, B.E., Ivey, S.J., Moorehead, H., Lunn, P., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., and Lamar, K.C. (2003). Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. *Vet. Ther.* **4**, 299–308.

O'Rourke, D. (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: a review. *Ir. Vet. J.* **62**, S15–S20

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* **54**, 399–409.

Owens, W.E., and Nickerson, S.C. (2011). Mastitis Therapy and Control | Medical Therapy Options. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, J.W. Fuquay, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 435–439.

Petzer, I.-M., Lourens, D.C., Schans, V.D., J, T., Watermeyer, J.C., van Reenen, R., Rautenbach, G.H., and Thompson, P. (2009). Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: Efficacy of 6 different dry-cow intramammary antimicrobial products. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **80**, 23–30.

Pinedo, P., Risco, C., and Melendez, P. (2011). A retrospective study on the association between different lengths of the dry period and subclinical mastitis, milk yield, reproductive performance, and culling in Chilean dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 106–115.

Popovic Z (2004) Performance and udder health status of dairy cows influenced by organically bound zinc and chromium. Ph.D. thesis, University of Belgrade, Servia

Prescott, J. (2013a). Chapter 8 Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.519-528

Prescott, J. (2013b). Chapter 9 Beta-lactam Antibiotics: Cephalospins. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.519-528

Prescott, J. (2013c). Chapter 17 Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations . In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.519-528

Pyörälä, S. (2008). Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 43 Suppl 2, 252–259.

Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Ir. Vet. J.* 62, S40–S44.

Rabiee, A.R., and Lean, I.J. (2013). The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96, 6915–6931.

Radostits O, Gay C, Hinchcliff K, Constable P, (2007) *Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 8ª edição, Saunders, Elsevier Company, Estados Unidos da América, ISBN – 13: 978-0702027772;

Rajala-Schultz, P.J., Hogan, J.S., and Smith, K.L. (2005). Short communication: association between milk yield at dry-off and probability of intramammary infections at calving. *J. Dairy Sci.* 88, 577–579.

Raspanti, C.G., Bonetto, C.C., Vissio, C., Pellegrino, M.S., Reinoso, E.B., Dieser, S.A., Bogni, C.I., Larriestra, A.J., and Odierno, L.M. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 50–56.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia* L 226/22. Bruxelas

Retamal, P.M. (2011). Nutritional Management of the Prepartum Dairy Cow. In *Dairy Production Medicine*, p.7-17

Roberson, J.R. (2012). Treatment of Clinical Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 271–288.

Rocha, B., Mendonça, D., and Niza-Ribeiro, J. (2014). Trends in Antibacterial Resistance of Major Bovine Mastitis Pathogens in Portugal *Evolução de Padrões de Resistência a Antibióticos em Agentes Etiológicos da Mastite Bovina em Portugal*. RCPV.109,79-88

Royster, E., and Wagner, S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 31, 17–46.

Ruegg, P.L. (2011). Managing Mastitis and Producing Quality Milk. In *Dairy Production Medicine*, p.207-232

Ruegg, P.L. (2012). New Perspectives in Udder Health Management. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 149–163.

Ruegg, P.L., Erskine, R.J., and Morin, D.E. (2015). Chapter 36: Mammary Gland Health. In *Large Animals Internal Medicine*, (Missouri: Elsevier),EUA,ISBN:9780323088398 pp. 1015–1044.

Santman-Berends, I.M.G.A., Swinkels, J.M., Lam, T.J.G.M., Keurentjes, J., and van Schaik, G. (2016). Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *J. Dairy Sci.* 99, 2930–2939.

Santschi, D.E., and Lefebvre, D.M. (2014). Review: Practical concepts on short dry period management. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 381–390.

Schlamberger, G., Wiedemann, S., Viturro, E., Meyer, H.H.D., and Kaske, M. (2010). Effects of continuous milking during the dry period or once daily milking in the first 4 weeks of lactation on metabolism and productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2471–2485.

Schukken, Y., Chuff, M., Moroni, P., Gurjar, A., Santisteban, C., Welcome, F., and Zadoks, R. (2012). The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 239–256.

Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Sipka, A., et al. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 270–289.

Sharma, N., Singh, N.K., and Bhadwal, M.S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 24, 429–438.

Sipka, A., Pomeroy, B., Klaessig, S., and Schukken, Y. (2016). Bovine natural killer cells are present in *Escherichia coli* infected mammary gland tissue and show antimicrobial activity in vitro. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 54–60.

Sordillo, L.M., and Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 135–146.

Sordillo, L.M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.* 98, 89–99.

Suojala, L., Kaartinen, L., and Pyörälä, S. (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 36, 521–531.

Tiwari, J., Babra, C., Tiwari, H.K., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., Paxman, A., Morgan, E., Costantino, P., Sunagar, R., et al. (2013). Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *J Vaccines Vaccin* 4, 8–11.

Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., and Schoenberger, P.S. (1991). Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52, 184–188.

Tucker, H.A. (1985). *Endocrine and Neural Control of the Mammary Gland* (Publ. Iowa State University Press: Bruce L. Larson).

Vieira, J.F. da S. (2010). Estudo retrospectivo sobre agentes de mastites e sua sensibilidade a antimicrobianos em explorações de Montemor-o-Velho. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp 115.

Wagner, S., and Erskine, R. (2013). Chapter 30. Antimicrobial Drug Use in Mastitis. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford, Reino Unido, ISBN:9780470963029, pp.519-528

Watters, R.D., Guenther, J.N., Brickner, A.E., Rastani, R.R., Crump, P.M., Clark, P.W., and Grummer, R.R. (2008). Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91, 2595–2603.

Weiss, W.P., Hogan, J.S., Todhunter, D.A., and Smith, K.L. (1997). Effect of Vitamin E Supplementation in Diets with a Low Concentration of Selenium on Mammary Gland Health of Dairy Cows¹. *J. Dairy Sci.* 80, 1728–1737.

Williamson, J.H., Woolford, M.W., and Day, A.M. (1995). The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *N. Z. Vet. J.* 43, 228–234.

Anexo I: Noroseal®: Resumo das características do medicamento



RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO

1. NOME DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO

Noroseal 2,6g suspensão intramamária para bovinos (vacas leiteiras)

2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Cada seringa intramamária de 4g contém:

Substância ativa:

Subnitrato de bismuto, pesado 2,6g

Para a lista completa de excipientes, ver secção 6.1.

3. FORMA FARMACÊUTICA

Suspensão intramamária.

Suspensão castanho-clara.

4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS

4.1 Espécies-alvo

Bovinos (vacas leiteiras).

4.2 Indicações de utilização, especificando as espécies-alvo

Prevenção de infeções intramamárias ascendentes ao longo do período seco.

Em vacas que sejam consideradas como estando provavelmente livres de mastite subclínica, o medicamento veterinário poderá ser adequado para utilização isolada na gestão do período seco das vacas no controlo das mastites.

A seleção de vacas para tratamento com o medicamento veterinário deve ser baseada na avaliação clínica do Médico Veterinário. Os critérios de seleção podem ser baseados no historial de mastite e na contagem de células das vacas individuais, ou em testes reconhecidos para a deteção de mastite subclínica ou amostragens bacteriológicas.

4.3 Contraindicações

Não administrar o medicamento veterinário isoladamente em vacas com mastite clínica ou subclínica durante o período de secagem. Consultar a secção 4.5

Não administrar a vacas em lactação.

4.4 Advertências especiais

Em ensaios clínicos de campo a administração do medicamento veterinário foi combinada com a administração de um antimicrobiano intramamário de longa ação, no período de secagem.



4.5 Precauções especiais de utilização

Precauções especiais para utilização em animais

É boa prática observar regularmente as vacas em período seco para detectar sinais de mastite clínica.

Se um quarto selado desenvolver mastite clínica, o quarto afetado deve ser limpo manualmente antes da terapia apropriada ser instituída.

Para reduzir o risco de contaminação, não mergulhar a seringa em água.

Utilizar a seringa apenas uma vez.

É importante respeitar uma rigorosa técnica assética para a administração do medicamento veterinário, uma vez que não possui atividade antimicrobiana.

Não administrar qualquer outro medicamento veterinário intramamário no seguimento da administração deste medicamento veterinário.

Em vacas que poderão ter mastite subclínica, o medicamento veterinário poderá ser utilizado no seguimento da administração de um tratamento antibiótico para vacas em período seco adequado no quarto infetado.

Precauções especiais a adoptar pela pessoa que administra o medicamento aos animais

Evitar o contacto com a pele ou com os olhos.

Caso ocorra contacto com a pele ou com os olhos, lavar a área afetada com água abundante.

Se a irritação persistir, procurar conselho médico e mostrar o rótulo ao médico.

Se sabe que é alérgico aos sais de bismuto, evite utilizar este medicamento.

Lavar as mãos após a administração.

4.6 Reações adversas (frequência e gravidade)

Desconhecidas

4.7 Utilização durante a gestação, a lactação e a postura de ovos

Gestação:

Uma vez que o medicamento veterinário não é absorvido sistemicamente após administração, pode ser utilizado em animais gestantes. Durante a lactação, o selo poderá ser ingerido pelo vitelo. A ingestão do medicamento veterinário pelo vitelo é segura e não produz efeitos adversos.

Lactação:

Se utilizado de modo accidental numa vaca no período de lactação, poderá ser observado um aumento transitório na contagem de células somáticas (até 2 vezes). Caso isso aconteça, retirar o selo manualmente, não sendo necessárias precauções adicionais.

4.8 Interações medicamentosas e outras formas de interação

Em ensaios clínicos, a compatibilidade do medicamento veterinário só foi demonstrada com um preparado para vacas em período seco contendo cloxacilina.

4.9 Posologia e via de administração

Uso intramamário.

Infundir o conteúdo de uma seringa do medicamento veterinário em cada quarto imediatamente após a última ordenha da lactação (na secagem). Não massajar o teto ou o úbere após a administração do medicamento veterinário.



É importante garantir a não introdução de agentes patogénicos no teto, de modo a reduzir o risco de mastite pós-infusão (técnica assética).

É essencial que o teto esteja bem limpo e desinfetado, com álcool cirúrgico ou toalhetes impregnados em álcool. Os tetos devem ser limpos até que os toalhetes não apresentem sujidade visível. Deixar que os tetos sequem antes da infusão. Fazer a infusão assepticamente e ter o cuidado de evitar a contaminação do bico da seringa. Depois da infusão, é aconselhável utilizar um desinfetante ou spray apropriado.

Em condições de frio, o medicamento veterinário pode ser aquecido à temperatura ambiente num ambiente quente de forma a facilitar a seringabilidade. O medicamento veterinário deve ser aquecido em água tépida durante 5 minutos.

4.10 Sobredosagem (sintomas, procedimentos de emergência, antídotos), (se necessário)

A administração do dobro da dose recomendada em vacas não produziu efeitos clínicos adversos.

4.11 Intervalo(s) de segurança

Carne e vísceras: zero dias.

Leite: zero horas

5. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapêutico: Medicamentos vários para tetos e úberes.

Código ATCvet: QG52X

5.1 Propriedades farmacodinâmicas

A infusão do medicamento veterinário em cada quarto de úbere produz uma barreira física contra a penetração de bactérias, reduzindo a incidência de infeções intramamárias ascendentes durante o período seco.

5.2 Propriedades farmacocinéticas

O subnitrato de bismuto, pesado, não é absorvido pela glândula mamária, permanecendo como selante do teto até que seja fisicamente removido (como demonstrado em vacas com um período seco de até 100 dias).

6. INFORMAÇÕES FARMACÊUTICAS

6.1 Lista de excipientes

Estereato de Alumínio

Povidona, iodinada

Parafina Líquida

6.2 Incompatibilidades

Desconhecidas

6.3 Prazo de validade



Prazo de validade do medicamento veterinário tal como embalado para venda: 3 anos

6.4. Precauções especiais de conservação

Este medicamento veterinário não necessita de quaisquer precauções especiais de conservação.

6.5 Natureza e composição do acondicionamento primário

Seringa de polietileno de baixa densidade com um bico suave fechado hermeticamente.

Apresentações:

Caixas de 24 ou 60 seringas.

Balde com 120 seringas.

É possível que não sejam comercializadas todas as apresentações.

6.6 Precauções especiais para a eliminação de medicamentos veterinários não utilizados ou de desperdícios derivados da utilização desses medicamentos

O medicamento veterinário não utilizado ou os seus desperdícios devem ser eliminados de acordo com a legislação em vigor.

7. TITULAR DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

Norbrook Laboratories Limited
Station Works
Camlough Road
NEWRY
Co. Down
BT35 6JP
Irlanda do Norte

8. NÚMERO DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

687/01/13DFVPT

9. DATA DA PRIMEIRA AUTORIZAÇÃO/RENOVAÇÃO DA AUTORIZAÇÃO

4 de Julho de 2013

10. DATA DA REVISÃO DO TEXTO

Agosto de 2014

PROIBIÇÃO DE VENDA, FORNECIMENTO E/OU UTILIZAÇÃO

Medicamento veterinário sujeito a receita médico-veterinária.

Anexo II: Cepravin®: Resumo das características do medicamento



Ministério da Agricultura,
Mar, Ambiente e
Ordenamento do Território

DGAV
Direção - Geral
de Alimentação
e Veterinária

1. NOME DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO

Cepravin DC 250 mg, Suspensão intramamária para bovinos

2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Cada seringa contém:

Substância ativa:

Cefalónio (como cefalónio dihidrato) 250mg

Excipientes:

Distearato de alumínio
Parafina líquida

Para a lista completa de excipientes, ver secção 6.1.

3. FORMA FARMACÊUTICA

Suspensão intramamária
Suspensão intramamária esbranquiçada a amarelo clara.

4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS

4.1 Espécie alvo

Bovinos (vacas secas).

4.2 Indicações de utilização, especificando as espécies alvo

Para o tratamento de infeções sub-clínicas do úbere e prevenção de novas infeções que possam ocorrer durante o período de secagem de vacas.

4.3 Contraindicações

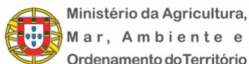
Não administrar em caso de hipersensibilidade às penicilinas ou cefalosporinas.
Não administrar a vacas lactantes.

4.4 Advertências especiais

Não existem.

4.5 Precauções especiais de utilização

Precauções especiais para utilização em animais



DGAV
Direção - Geral
de Alimentação
e Veterinária

A administração do medicamento veterinário deve basear-se em testes de sensibilidade a bactérias isoladas dos animais. Se tal não for possível, deve ter-se em conta a informação epidemiológica local (regional, a nível da exploração) relativa à sensibilidade das bactérias-alvo.

Não dobrar a cânula da seringa.

Evitar a contaminação da cânula da seringa após remoção da tampa.

Não utilizar o toalhete de limpeza em tetos com feridas abertas.

Precauções especiais que devem ser tomadas pela pessoa que administra o medicamento aos animais

Lavar as mãos antes da administração.

As penicilinas e as cefalosporinas podem provocar hipersensibilidade (alergia) depois da injeção, inalação, ingestão ou contacto com a pele. A hipersensibilidade às penicilinas pode conduzir a sensibilidade cruzada às cefalosporinas e vice versa. Ocasionalmente, as reações alérgicas a estas substâncias podem ser graves.

Não manusear este medicamento veterinário quando é conhecida uma sensibilização a penicilinas e cefalosporinas ou sido advertido para não manusear este tipo de preparações.

Caso se desenvolvam sintomas depois da exposição, tais como “*rash*” cutâneo, deverão ser procurados cuidados médicos e mostrado este aviso ao médico. A tumefação da face, dos lábios ou dos olhos ou dificuldade respiratória, são sintomas mais graves que requerem cuidados médicos urgentes.

4.6 Reações adversas (frequência e gravidade)

Desconhecidas.

4.7 Utilização durante a gestação, a lactação e a postura de ovos

Para administrar durante o último trimestre de gestação, assim que a vaca entra no período seco.

Não existe efeito adverso no feto.

Não administrar a vacas em lactação.

4.8 Interações medicamentosas e outras formas de interação

Desconhecidas.

4.9 Posologia e via de administração

Administração intramamária.

Deve ser introduzido o conteúdo de uma seringa no canal do teto de cada quarto imediatamente após a última ordenha.



Ministério da Agricultura,
Mar, Ambiente e
Ordenamento do Território

DGAV
Direção - Geral
de Alimentação
e Veterinária



1. Após completar a ordenha, limpar cuidadosamente e desinfetar o teto com o toalhete de limpeza fornecido.



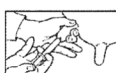
2(i). Opção 1: Para administração intramamária sem inserir totalmente a cânula da seringa:

Segurar o cilindro da seringa e a base da tampa numa mão e rodar a pequena parte superior da tampa acima do traço (a parte da base da tampa permanece na seringa). Tomar as devidas precauções para não contaminar a pequena porção exposta da cânula.



2(ii). Opção 2: Para administração intramamária inserindo totalmente a cânula da seringa:

Remover completamente a tampa segurando o cilindro da seringa firmemente numa mão e puxar a tampa de modo a retirá-la. Tomar as devidas precauções para não contaminar a cânula.



3 – Inserir a cânula da seringa no canal do teto e aplicar uma pressão constante no êmbolo até que se tenha sido inserido a totalidade da dose. Segurando a extremidade do teto com uma mão, massajar suavemente no sentido ascendente com a outra mão para ajudar à dispersão do medicamento veterinário no quarto.

4.10 Sobredosagem (sintomas, procedimentos de emergência, antídotos), (se necessário)

Doses repetidas durante três dias consecutivos não demonstraram ou produziram qualquer reação adversa nas vacas.

4.11 Intervalo de segurança

Carne e vísceras: 21 dias

Leite:

Intervalo entre tratamento-parto ≥ 51 dias: Intervalo de segurança = 96 horas após o parto.

Intervalo entre tratamento-parto < 51 dias Intervalo de segurança = 51 dias mais 96 horas após o parto.

Se a vaca sofrer de hipocalcémia, poderá ser necessário descartar o leite por um maior período de tempo.



Ministério da Agricultura,
Mar, Ambiente e
Ordenamento do Território

DGAV
Direção - Geral
de Alimentação
e Veterinária

Deverá ser comprovado analiticamente a ausência de antibiótico antes da utilização do leite para consumo humano. Este procedimento é aconselhável devido à variabilidade da capacidade das vacas leiteiras excretarem o antibiótico.

5. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapêutico: Cefalosporinas
Código ATCvet: QJ51DB90

5.1 Propriedades farmacodinâmicas

O cefalónio é uma cefalosporina com ação bactericida contra a maioria dos microrganismos associados às mastites bovinas. É ativo contra *Staphylococcus aureus* (incluindo estirpes penicilinoresistentes), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Actinomyces pyogenes* e *Corynebacterium ulcerans*, *Streptococcus uberis*, *E. coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella*, *Citrobacter* spp e *Enterobacter*.

O seu mecanismo de ação resulta na inibição da síntese da parede celular das bactérias.

Foram colhidas entre 2000 e 2006, um total de 412 isolados gram positivos e 184 isolados gram negativos. Foi dada especial atenção aos seguintes patógenos associados a mastites: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Arcanobacterium pyogenes*.

As CMI₉₀ para as estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces pyogenes* foi de 0,125 µg/ml, para o *Streptococcus agalactiae* foi de 0,0156 µg/ml, para o *Streptococcus dysgalactiae* foi de 0,0078 µg/ml, para o *Streptococcus uberis* foi de 0,06 µg/ml, para a *E. coli* e *Klebsiella* foi de 2 µg/ml.

Níveis efetivos de cefalónio são mantidos na maioria dos quartos até 10 semanas após a administração do medicamento veterinário. As vacas tratadas com o medicamento veterinário têm menor número de células somáticas após parto.

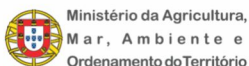
5.2 Propriedades farmacocinéticas

Após a administração o cefalónio é extensamente mas lentamente absorvido pelo úbere e excretado primeiramente na urina.

6. INFORMAÇÕES FARMACÊUTICAS

6.1 Lista de excipientes

Distearato de alumínio
Parafina líquida



DGAV
Direção - Geral
de Alimentação
e Veterinária

6.2 Incompatibilidades

Não são conhecidas incompatibilidades.

6.3 Prazo de validade

Prazo de validade do medicamento veterinário tal como embalado para venda: 3 anos

6.4 Precauções especiais de conservação

Conservar a temperatura inferior a 25°C.

6.5 Natureza e composição do acondicionamento primário

Seringa em polietileno branco com tampa dupla em polietileno vermelha.
Embalagem com 4 seringas precheias, contendo 3 g, e 4 toalhotes de limpeza.
Embalagem com 20 seringas precheias, contendo 3 g, e 20 toalhotes de limpeza.

É possível que não sejam comercializadas todas as apresentações

6.6 Precauções especiais para a eliminação de medicamentos veterinários não utilizados ou de desperdícios derivados da utilização desses medicamentos

O medicamento veterinário não utilizado ou os seus desperdícios devem ser eliminados de acordo com a legislação em vigor.

7. TITULAR DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

MSD Animal Health Lda.
Edifício Vasco da Gama nº 19,
Quinta da Fonte, Porto Salvo
2770-192 Paço de Arcos

8. NÚMERO DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

623/01/12NFVPT

9. DATA DA PRIMEIRA AUTORIZAÇÃO/RENOVAÇÃO DA AUTORIZAÇÃO

19 de Junho de 1991

10. DATA DA REVISÃO DO TEXTO

Dezembro de 2012

Anexo III: Virbactan ®: Resumo das características do medicamento



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO MAR



1. NOME DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO

Virbactan 150 mg pomada intramamária

2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Cada seringa pré-carregada de 3 g contém:

Substância activa:

Cefquinoma (na forma de sulfato): 150,0 mg.

Para a lista completa de excipientes ver secção 6.1.

3. FORMA FARMACÊUTICA

Pomada intramamária

Pomada gordurosa e homogênea de cor esbranquiçada.

4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS

4.1 Espécie -alvo

Bovinos (vacas durante o período de secagem).

4.2 Indicações de utilização especificando a espécie -alvo

Para o tratamento de mamites subclínicas durante o período de secagem e prevenção de novas infecções bacterianas do úbere em bovinos de leite, durante o período de secagem, causadas pelos seguintes organismos sensíveis à cefquinoma: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e estafilócocos coagulase negativos.

4.3 Contra-indicações

Não administrar em caso de hipersensibilidade conhecida aos antibióticos contendo cefalosporinas ou a outros antibióticos β -lactâmicos.

Não administrar a vacas com mamites clínicas.

Ver secção 4.7.

4.4 Advertências especiais para cada espécie -alvo

Não existem.

4.5 Precauções especiais de utilização

Precauções especiais para utilização em animais

A administração do medicamento veterinário deve basear-se em testes de sensibilidade. Caso isso não seja possível, a terapêutica deve basear-se na informação epidemiológica disponível a nível local (regional, própria exploração) sobre a sensibilidade da bactéria alvo.

Não utilizar os toalhetes de limpeza em tetos lesionados.

Em caso de administração incorrecta durante a lactação o leite deve ser rejeitado durante 35 dias.

A eficácia do medicamento veterinário está apenas estabelecida contra os agentes patogénicos mencionados na secção 4.2 “Indicações de utilização”. Consequentemente, mastites agudas graves (potencialmente fatais) provocadas por outras espécies de agentes patogénicos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, poderão ocorrer após a secagem. Boas práticas de higiene deverão ser cuidadosamente respeitadas de forma a reduzir esse risco; as vacas deverão ser alojadas num recinto higiénico distante das salas de ordenha e verificadas regularmente durante vários dias após a secagem.

Precauções especiais que devem ser tomadas pela pessoa que administra o medicamento aos animais

As penicilinas e as cefalosporinas podem provocar hipersensibilidade (alergia) depois da injeção, inalação, ingestão ou contacto cutâneo. A hipersensibilidade às penicilinas pode conduzir a sensibilidade cruzada às cefalosporinas e vice-versa. Ocasionalmente, as reacções alérgicas a estas substâncias activas podem ser graves.

Não manusear este medicamento veterinário quando é conhecida uma hipersensibilidade às penicilinas ou cefalosporinas, ou quando foi avisado para não manipular este tipo de medicamentos.

Manusear este medicamento veterinário com precaução de forma a evitar o contacto. Utilizar luvas de protecção quando manusear e administrar este medicamento veterinário. Lavar a pele exposta após a administração do medicamento veterinário.

Caso surjam sintomas como “rash” cutâneo após a exposição, consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe o folheto informativo do medicamento veterinário. A tumefacção da face, dos lábios ou dos olhos, ou dificuldades respiratórias, são sintomas mais graves que requerem cuidados médicos urgentes. Pessoas que desenvolvam reacções após o contacto com o medicamento veterinário (e outros medicamentos contendo cefalosporinas e penicilinas) devem evitar manuseá-lo novamente.

Lavar as mãos depois de utilizar os toalhetes e utilizar luvas de protecção caso seja conhecida ou se suspeite de uma irritação cutânea causada pelo álcool isopropílico. Evitar o contacto com os olhos uma vez que o álcool isopropílico pode provocar irritação.

4.6 Reacções adversas (frequência e gravidade)

Desconhecidas.

4.7 Utilização durante a gestação, a lactação e a postura de ovos

Não existe evidência de toxicidade reprodutiva (incluindo teratogenicidade) em bovinos.

Os estudos laboratoriais realizados em ratos e em coelhos não revelaram quaisquer efeitos teratogénicos, fetotóxicos ou maternotóxicos.

Este medicamento veterinário destina-se a ser administrado durante a gestação. Nos ensaios clínicos não foram registados efeitos adversos nos fetos.

Não administrar durante a lactação.

4.8 Interações medicamentosas e outras formas de interacção

Ver ponto 5.1 relativamente à resistência cruzada no grupo das cefalosporinas.

O efeito de neutralização da acção bactericida da cefquinoma por antimicrobianos com acção bacteriostática (macrólidos, sulfonamidas e tetraciclina) ainda não foi avaliado. Assim, não existe informação disponível sobre a segurança e a eficácia deste tipo de associação.

4.9 Posologia e via de administração

Administração única por via intramamária.

Introduzir cuidadosamente 150 mg de cefquinoma, i.e., o conteúdo de uma seringa, no teto de cada quarto, imediatamente após a última ordenha.

O leite do úbere deve ser completamente retirado antes de infundir. O teto e o seu orifício devem ser completamente limpos e desinfetados com o toalhete de limpeza fornecido. Devem ser tomados os cuidados necessários de forma a evitar a contaminação da cânula do injetor. Introduzir cuidadosamente cerca de 5mm ou a totalidade da cânula e infundir o conteúdo de uma seringa em cada quarto. Massajar suavemente o teto e o úbere para facilitar a distribuição do medicamento veterinário.

A seringa só deve ser utilizada uma vez.

4.10 Sobredosagem (sintomas, procedimentos de emergência, antídotos), se necessário

Não relevante.

4.11 Intervalo (s) de segurança

Carne e vísceras: 2 dias.

Leite: 1 dia após o parto quando o período de secagem é superior a 5 semanas

36 dias após o tratamento quando o período de secagem é igual ou inferior a 5 semanas

5. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Substância activa: cefquinoma

Grupo farmacoterapêutico: cefalosporinas e substâncias relacionadas

Código ATCvet: QJ51DE90

Grupo de substâncias: antibacterianos para administração intramamária.

5.1 Propriedades farmacodinâmicas

A cefquinoma é uma cefalosporina de largo espectro, da quarta geração que actua por inibição da síntese da parede celular. É bactericida e caracteriza-se pelo seu largo espectro de actividade terapêutica e por apresentar uma elevada estabilidade frente às penicilinas e beta-lactamases.

A sua actividade *in vitro* foi demonstrada frente a bactérias comuns Gram-positivas e Gram-negativas incluindo *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pasteurella* spp, *Proteus* spp, *Salmonella* spp, *Serratia marcescens*, *Aerobacterium pyogenes*, *Corynebacterium* spp, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativos, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*.

Entre 2000 e 2002 foi realizado na Alemanha, França, Bélgica e Holanda um estudo de campo que provou que as espécies de bactérias a seguir referidas são sensíveis à cefquinoma com valores de CMI entre $\leq 0,008 \mu\text{g/ml}$ e $2,0 \mu\text{g/ml}$: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativos, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*.

No quadro abaixo é apresentado um resumo dos valores da CMI₉₀ para cada bactéria patogénica:

Espécie bacteriana isolada	CMI ₉₀ (µg/ml)
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	<u>0.5</u>
Estafilococos coagulase negativos	<u>0.5</u>
<u><i>Streptococcus uberis</i></u>	<u>0.063</u>
<u><i>Streptococcus dysgalactiae</i></u>	<u><0.008</u>
<u><i>Streptococcus agalactiae</i></u>	<u>0.032</u>

A cefquinoma, enquanto cefalosporina da quarta geração combina uma elevada capacidade de penetração celular com uma estabilidade face à β -lactamase. Em contraste com as cefalosporinas das gerações anteriores, a cefquinoma não é hidrolisada pelas cefalosporinases cromossómico - codificadas do tipo Amp - C, ou pelas cefalosporinases plasmídeo - mediadas de algumas espécies de enterobactérias. No entanto, algumas beta-lactamases de largo espectro (ESBL) promovem a hidrólise da cefquinoma e de cefalosporinas de outras gerações. O potencial para o desenvolvimento de resistência face à cefquinoma é um pouco baixo. Um elevado grau de resistência à cefquinoma requer a co-existência de duas modificações genéticas, i.e., hiperprodução de β -lactamases específicas e diminuição da permeabilidade da membrana.

Não foi descrita qualquer resistência cruzada em relação ao mecanismo de alteração da proteína de ligação à penicilina descoberta em bactérias Gram positivas. Resistência devida a alterações na permeabilidade da membrana pode resultar em resistência cruzada.

5.2 Propriedades farmacocinéticas

A reabsorção sistémica da cefquinoma a partir do úbere é insignificante. A concentração da cefquinoma nas secreções do úbere seco atinge o pico após 7 a 14 dias e diminui lentamente durante o período de secagem.

6. INFORMAÇÕES FARMACÉUTICAS

6.1 Lista de excipientes

Sílica coloidal hidrofóbica

Parafina líquida

6.2 Incompatibilidades

Desconhecidas.

6.3 Prazo de validade

Prazo de validade do medicamento veterinário tal como embalado para venda: 2 anos

6.4 Precauções especiais de conservação

Este medicamento veterinário não necessita de quaisquer precauções especiais de conservação.

6.5 Natureza e composição do acondicionamento primário

Seringa pré -carregada de 3 g com:

-tubo em polietileno de alta densidade (HDPE)
-êmbolo em polietileno de baixa densidade (LDPE)
-tampa de proteção em polietileno de baixa densidade (LDPE)

Caixa com 1 saqueta de 4 aplicadores e 4 toalhetes de limpeza.
Caixa com 5 saquetas de 4 aplicadores e 20 toalhetes de limpeza.
Caixa com 6 saquetas de 4 aplicadores e 24 toalhetes de limpeza.
Caixa com 15 saquetas de 4 aplicadores e 60 toalhetes de limpeza.
Caixa com 30 saquetas de 4 aplicadores e 120 toalhetes de limpeza.

É possível que não sejam comercializadas todas as apresentações.

6.6 Precauções especiais para a eliminação dos medicamentos veterinários não utilizados ou de resíduos derivados da utilização desses medicamentos

O medicamento veterinário não utilizado ou os seus resíduos devem ser eliminados de acordo com a legislação em vigor.

7. TITULAR DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

Virbac
1^{ère} avenue, 2065 M, L.I.D.
06516 Carros Carros,
França

8. NÚMERO DE REGISTO DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO

51551

9. DATA DA PRIMEIRA AUTORIZAÇÃO/RENOVAÇÃO DA AUTORIZAÇÃO

Data da AIM: 25 de Março de 2004
Data da Renovação Quinquenal: 25 de Março de 2009

10 DATA DA REVISÃO DO TEXTO

Fevereiro de 2015

PROIBIÇÃO DE VENDA, FORNECIMENTO E/OU UTILIZAÇÃO

Não aplicável.